



# Dynamique des filaments d'actine: de la molécule individuelle à la formation de structures organisées

Alphée Tristan Michelot

## ► To cite this version:

Alphée Tristan Michelot. Dynamique des filaments d'actine: de la molécule individuelle à la formation de structures organisées. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00164946

**HAL Id: tel-00164946**

**<https://theses.hal.science/tel-00164946>**

Submitted on 24 Jul 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
GRENOBLE  
– ECOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE –**

Spécialité : Physique des Sciences du Vivant.

Présenté par

**Alphée MICHELOT**

**Dynamique des filaments d'actine**

De la molécule individuelle à la formation de structures organisées

Soutenue le Vendredi 06 Juillet 2007 devant le jury composé de:

Pr. Franz BRUCKERT  
Dr. Marie-France CARLIER  
Dr. Cecile SYKES  
Dr. Isabelle SAGOT  
Dr. Jean-Louis MARTIEL  
Dr. Laurent BLANCHON



# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>1</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>I Le cytosquelette cellulaire</b>	<b>9</b>
<i>I-1/ Exercer des forces : une nécessité pour la cellule.</i>	9
<i>I-2/ Les différents acteurs du cytosquelette.</i>	9
I-2-1/ Le cytosquelette microtubulaire.	10
I-2-2/ Les filaments intermédiaires.	10
I-2-3/ Le cytosquelette d'actine.	10
<i>I-3/ Organisation cellulaire des filaments d'actine.</i>	11
<i>I-4/ Dynamique de l'actine dans la cellule.</i>	12
<b>II Dynamique de l'actine <i>in vitro</i> et rôle des ABPs sur la régulation de la dynamique du cytosquelette et sa structuration.</b>	<b>16</b>
<i>II-1/ L'actine in vitro, sa dynamique intrinsèque.</i>	16
II-1-1/ Base structurale du monomère et du filament d'actine.	16
II-1-2/ Les trois phases de la polymérisation de l'actine <i>in vitro</i> .	18
II-1-3/ L'hydrolyse du nucléotide influence la dynamique d'assemblage des filaments d'actine.	20
II-1-4/ Le "turnover simple" des filaments d'actine ou "treadmilling".	21
<i>II-2/ Contrôle de la dynamique de l'actine.</i>	23
II-2-1/ Des protéines régulatrices pour un cytosquelette organisé et dynamique.	23
<i>II-3/ Caractéristiques des principales ABPs.</i>	24
II-3-1/ La profiline.	24
II-3-2/ Les protéines de coiffe.	25
II-3-3/ Les facteurs de nucléation de l'actine.	26
II-3-3-1/ Le complexe Arp 2/3.	24
II-3-3-2/ La famille des formines.	26



II-3-4-3/ Spire.	35
II-3-4/ Les facteurs de dépolymérisation.	39
II-3-4-1/ La dépolymérisation des filaments se fait par l'ADF/cofiline.	36
II-3-4-2/ Mécanisme biochimique de l'ADF/cofiline.	36
II-3-4-3/ Mécanisme d'action de l'ADF/cofiline.	38
II-3-5/ Les protéines de stabilisation des filaments.	42
II-3-6/ Les protéines de réticulation.	42
<b>II-4/ Le modèle de nucléation dendritique.</b>	42
<b>II-5/ Le modèle de formation des câbles.</b>	43
<b>III L'étude <i>in vitro</i> des protéines du cytosquelette par l'imagerie.</b>	46
<b>III-1/ Notion de système biomimétique.</b>	46
<b>III-2/ L'essai de motilité.</b>	46
<b>III-3/ L'observation de microfilaments d'actine individuels en vidéomicroscopie.</b>	49
III-3-1/ Marquage des microfilaments à la phalloïdine fluorescente.	49
III-3-2/ Observation de microfilaments par la technique de microscopie à onde évanescente.	50
III-3-3/ Limites de la microscopie à onde évanescente.	53
<b>IV Physique du cytosquelette.</b>	54
<b>IV-1/ Propriétés mécaniques du polymère.</b>	54
IV-1-1/ Propriétés mécaniques d'un filament d'actine.	54
IV-1-2/ Interactions entre filaments d'actine et réticulation.	55
IV-1-3/ Propriétés des gels d'actine.	56
<b>IV-2/ Forces générées par la polymérisation d'un biopolymère.</b>	56
IV-2-1/ Origine physique de la génération de force par polymérisation de l'actine.	57
IV-2-2/ Données expérimentales sur la force de polymérisation exercée par un filament unique contre une cible.	58
IV-2-3/ Forces générées par un réseau de filaments d'actine.	60
IV-2-3-1/ Mesures <i>in vitro</i> de la force générée par un réseau de filaments d'actine.	57
IV-2-3-2/ L'essai de motilité à l'échelle mésoscopique.	58
IV-2-3-3/ Qu'en est-il <i>in vivo</i> au bord du lamellipode ?	59
IV-2-4/ Essai de motilité et brisure de symétrie.	62

<b>POSITION DU SUJET</b>	65
I/ <i>Caractérisation du mécanisme de nucléation d'Arabidopsis thaliana FORMIN1. Conséquences pour la formation des câbles d'actine in vitro.</i>	67
II/ <i>Accélération du turnover des filaments d'actine par l'ADF/cofiline. Conséquences pour la formation des câbles d'actine.</i>	70
<b>RESULTATS</b>	73
<u>Article 1 :</u> <i>Le domaine FH1 (Formin Homology 1 Domain) module l'activité de nucléation et de formation de câbles d'actine d'Arabidopsis FORMIN1.</i>	75
<u>Article 2 :</u> <i>Un nouveau mécanisme de formation des câbles de filaments d'actine par une formine non-processive.</i>	81
<u>Article 3 :</u> <i>Dynamique Stochastique de filaments d'actine individuels contrôlée par l'ADF/cofiline.</i>	89
<u>Article 4 :</u> <i>Les conditions d'attachement contrôlent le flambage des filaments d'actine et la production de forces.</i>	97
<u>Article 5 :</u> <i>L'activité de fragmentation de la villine améliore la motilité dépendante de l'actine in vivo.</i>	103
<b>CONCLUSION</b>	107
I Les protéines de la famille des formines présentent des différences mécanistiques majeures.	110
II Les formines sont capables d'organiser les filaments d'actine en câbles épais sans l'aide d'aucun autre partenaire.	111
III Dynamique stochastique des filaments d'actine contrôlée par la fragmentation induite par ADF/cofiline.	113
IV L'ADF/cofiline favorise la formation de structures rigides de filaments d'actine.	115
V Le flambage des filaments d'actine est un moyen performant de mesurer la force exercée par la polymérisation de l'actine.	116
<b>PERSPECTIVES</b>	119
<b>REFERENCES</b>	125



## Avant-propos

Cela fait maintenant quelques années qu'un nombre croissant de thèses privilégie l'interdisciplinarité entre la biologie et d'autres disciplines comme la physique, les mathématiques ou l'informatique. Cette thèse en est un exemple, et j'espère que le travail que j'ai réalisé sera une bonne illustration de ce que l'intégration de ces nouvelles disciplines peut apporter dans la compréhension des phénomènes biologiques.

J'ai essayé tout au long de ce manuscrit de faire percevoir ce que mes connaissances de physicien ont pu apporter au cours de ce travail de thèse. D'un point de vue technique tout d'abord ; Au sein des sciences du vivant, l'imagerie prend une place de plus en plus importante, et c'est le cas en particulier dans le domaine de la biochimie de l'actine. L'augmentation des performances des microscopes actuels permet d'observer le comportement dynamique des systèmes à l'échelle moléculaire, ce qui était inenvisageable il n'y a pas si longtemps. Non seulement ces nouvelles techniques d'imagerie apportent beaucoup de résultats (souvent complémentaires aux résultats apportés par les techniques plus anciennes), mais elles ont surtout apporté un aspect visuel à la dynamique de ces systèmes. Il est fort probable que cette révolution se poursuive dans les années à venir, comme le suggère le nombre d'études croissant dans le domaine utilisant la microscopie et le perfectionnement des instruments récents permettant de détecter la dynamique des molécules individuelles.

D'un point de vue expérimental ensuite; la présence au laboratoire de cultures scientifiques différentes nous a souvent permis d'aborder les problèmes avec des visions complémentaires. En particulier, en plus de l'approche biochimique utilisée habituellement pour expliquer la dynamique du cytosquelette, mes travaux ont essayé d'inclure le plus possible l'influence de la mécanique du système sur son comportement dynamique. C'est le cas par exemple pour la formation des câbles d'actine, mais aussi à propos du mécanisme d'action de l'ADF/cofiline vis-à-vis du désassemblage des filaments d'actine. Il me semble important pour l'avenir de continuer à combiner les approches mécaniques et biochimiques pour comprendre en détail la dynamique des structures organisées du cytosquelette.

Enfin, une part de mes travaux fait appel à la modélisation physique et informatique des phénomènes, réalisé grâce à l'équipe dirigée par Jean-Louis Martiel. Une des richesses de cette collaboration est de réussir à inclure dans les mêmes modèles cette approche duale entre biochimie et mécanique du système. La modélisation est maintenant ce qui permet de faire le lien entre la plupart des résultats expérimentaux, pour une compréhension plus détaillée et chiffrée de la dynamique du cytosquelette.

Ce manuscrit s'articule en trois parties. L'introduction résume les connaissances sur le cytosquelette d'actine nécessaires à la compréhension de mon travail, et essaie de relier au mieux les données biochimiques avec les propriétés physiques du polymère. La partie résultats, sous la forme de cinq articles publiés, présente les résultats que j'ai obtenus tout au long de mes trois années de thèse. Enfin, après une conclusion de ces résultats, ce manuscrit se termine par une ouverture vers de nombreuses questions qui restent ouvertes.

# **INTRODUCTION**



# I Le cytosquelette cellulaire

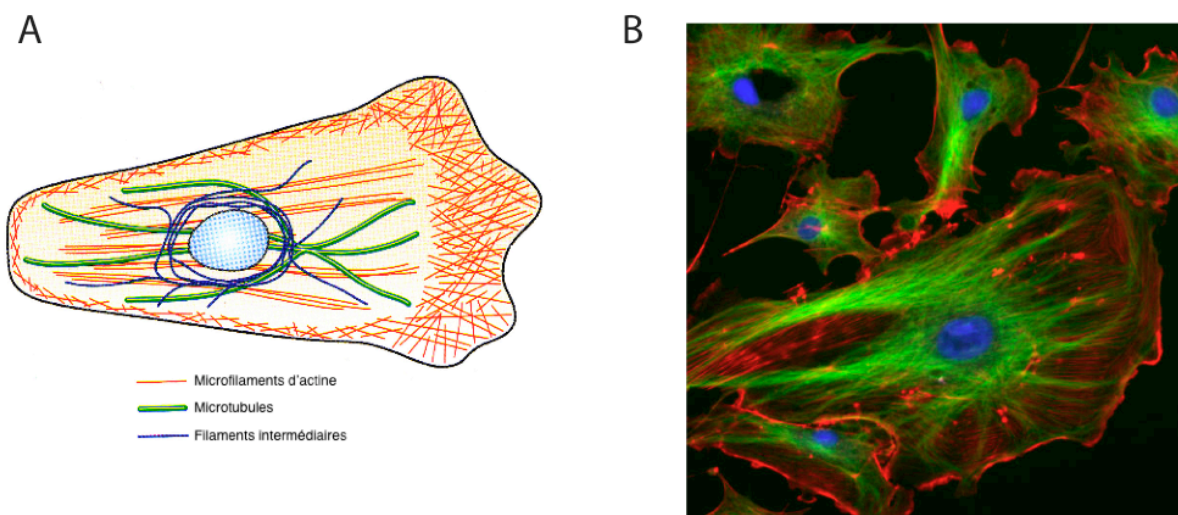
## *I-1/ Exercer des forces : une nécessité pour la cellule.*

Une caractéristique commune à tous les organismes vivants est la possibilité d'exercer des forces. En particulier, à l'échelle cellulaire, l'exercice de forces spatialement et temporellement contrôlées est nécessaire pour de nombreux processus impliquant la survie de la cellule, tels que la polarisation cellulaire, la division, la contraction, l'endocytose ou encore le transport intracellulaire.

Tous ces processus "motiles" sont contrôlés grâce à un assemblage de protéines en polymères biologiques, qui parcourent l'ensemble de la cellule et constituent son cytosquelette. Le cytosquelette eucaryote peut être divisé en réseaux secondaires, qui, par leurs propriétés respectives particulières, collaborent au bon fonctionnement de la cellule.

## *I-2/ Les différents acteurs du cytosquelette.*

Le cytosquelette des cellules eucaryotes est composé de trois polymères biologiques aux propriétés mécaniques particulières qui les prédisposent à des fonctions cellulaires précises : les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine (voir Figure 1).



**Figure 1: Les différents acteurs du cytosquelette cellulaire.**

(A) Schéma représentant l'organisation du cytosquelette dans une cellule eucaryote.  
(B) Cliché en microscopie de fluorescence d'une cellule endothéliale où l'actine a été marqué en rouge à la rhodamine phalloïdine, les microtubules en vert par un anticorps et les noyaux en bleu au DAPI.



### **I-2-1/ Le cytosquelette microtubulaire.**

La molécule de tubuline est un hétérodimère composé d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  (Howard and Hyman, 2003). Ces deux sous-unités présentent un repliement similaire avec 40% d'acides aminés identiques et peuvent fixer un nucléotide GTP ou GDP. L'assemblage de la tubuline aboutit à la formation de tubes hélicoïdaux appelés microtubules, ayant un diamètre approximatif de 25 nm et dont la couche externe est constituée de plusieurs protofilaments de tubuline. La polymérisation des microtubules est un processus polaire labile. En effet, les extrémités des microtubules polymérisent et dépolymérisent en permanence. Les deux extrémités des microtubules ont des propriétés différentes (polarité du microtubule). Il existe une extrémité "plus" où les dimères s'ajoutent et une extrémité "moins" qui au contraire perd progressivement ses dimères (à moins d'être stabilisée). La polymérisation met en jeu l'hydrolyse du GTP (Guanosine TriPhosphate). Une particularité mécanique fondamentale des microtubules est qu'ils sont des biopolymères très rigides, avec une longueur de persistance de plusieurs millimètres (en comparaison, la longueur de persistance de l'ADN est d'environ 50 nm). Les microtubules jouent un rôle très important lors de la division cellulaire en particulier, lors du positionnement du centrosome et du mouvement des chromosomes sur le fuseau mitotique. Cette rigidité exceptionnelle des microtubules en fait aussi des candidats particulièrement bons pour servir de véritables rails sur lesquels des moteurs moléculaires (kinésines), attachés aux structures à transporter, se déplacent. Le cytosquelette microtubulaire joue aussi un rôle important pour la régulation du cytosquelette d'actine (Basu and Chang, 2007).

### **I-2-2/ Les filaments intermédiaires.**

Les filaments intermédiaires ont un diamètre intermédiaire (de 8 à 12 nm) entre les microfilaments d'actine et les microtubules. Ces filaments ne semblent pas être aussi dynamiques que les microtubules et les microfilaments d'actine. Ils constituent donc grâce à leur élasticité exceptionnelle un support mécanique supplémentaire, comme une charpente cellulaire.

### **I-2-3/ Le cytosquelette d'actine.**

L'actine monomérique s'autoassemble pour former des microfilaments d'actine, de diamètre approximatif 8 nm, semi-flexibles puisque leur longueur de persistance est  $\approx 17 \mu\text{m}$ . Ces microfilaments ont une structure hélicoïdale double brin dont le pas est d'environ 72 nm, ce qui correspond à environ 28 sous-unités d'actine. Comme les microtubules, les microfilaments d'actine sont polarisés.

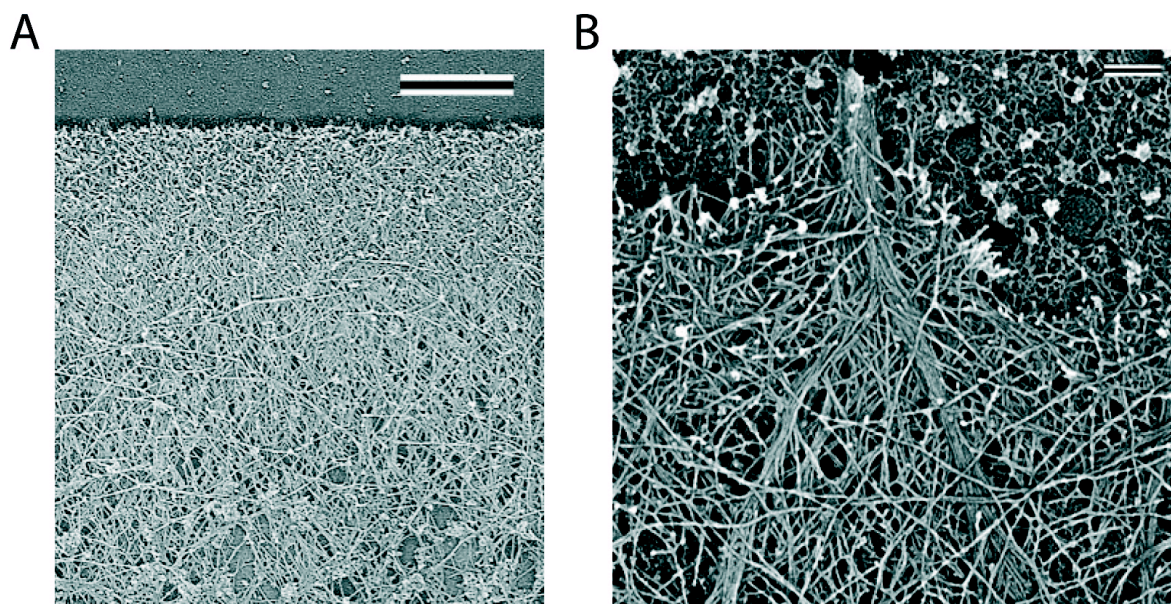
Au sein de la cellule, le cytosquelette d'actine est plus particulièrement responsable des phénomènes motiles, et de la transmission de forces en général. Comme pour les microtubules, il existe des moteurs moléculaires, les myosines, pouvant parcourir les filaments d'actine. En particulier, l'interaction entre l'actine et la myosine est directement responsable de la contractilité musculaire.

### ***I-3/ Organisation cellulaire des filaments d'actine.***

Les cellules eucaryotes sont capables d'organiser les microfilaments d'actine en de nombreuses structures différentes. L'actine filamenteuse peut exister sous la forme de longs filaments individuels, mais la plupart du temps, que ce soit pour répondre à des fonctions cellulaires précises ou pour résister à des contraintes mécaniques, les filaments d'actine sont organisés par la cellule en structures élaborées.

Essentiellement, deux types d'organisations de filaments d'actine cohabitent dans les différents types cellulaires chez les eucaryotes. Tout d'abord, les microfilaments peuvent être organisés en faisceaux parallèles appelés câbles d'actine (voir Figure 2B). On rencontre notamment ces structures chez la levure, dans la plante, mais on retrouve aussi de telles structures chez les vertébrés par exemple dans les fibres de stress, qui confèrent aux cellules des propriétés élastiques particulières, ou dans les filopodes, fines protrusions cellulaires en forme de doigts d'environ une centaine de nanomètre capables de déformer la membrane. L'organisation des filaments d'actine dans les câbles dépend généralement du type de structure. Par exemple, on retrouvera dans les filopodes de longs filaments d'actine ayant tous la même polarité (Vignjevic et al., 2003), alors que dans les fibres de stress ou dans les câbles d'actine trouvés chez la levure, l'actine est organisée en courts filaments de polarité aléatoire (Kamasaki et al., 2005), (Cramer et al., 1997).

Les microfilaments peuvent être aussi organisés sous forme de réseaux branchés denses (voir Figure 2A), comme dans les extensions cellulaires appelées lamellipodes, que l'on trouve dans différents types de cellules motiles tels que les kératocytes de poissons ou les leukocytes et les fibroblastes humains (Svitkina and Borisy, 1999a). Ces extensions sont souvent fines (de 0.1 à 0.2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pour une longueur et une largeur de lamellipode de plusieurs micromètres), et le réseau branché dense (la plupart du temps, les branches sont espacées de moins de 100 nm).



**Figure 2: Organisation cellulaire de l'actine filamenteuse.**

(A) Cliché de microscopie électronique du réseau branché de filaments d'actine au bord d'un lamellipode de kératocyte. Echelle : 1 µm. (tiré de (Svitkina and Borisy, 1999a)).

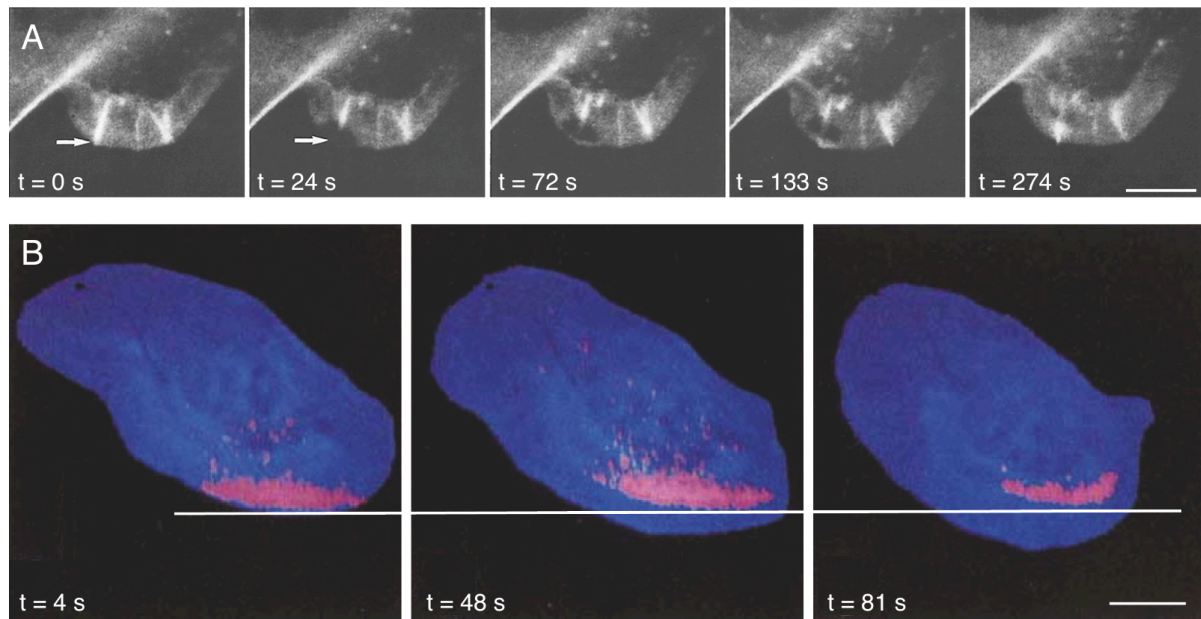
(B) Cliché de microscopie électronique d'un filopode au bord d'une cellule de mélanome, composé d'un réseau de filaments d'actine parallèles (ou câble d'actine). Echelle : 0.2 µm. (tiré de (Svitkina et al., 2003)).

#### ***I-4/ Dynamique de l'actine dans la cellule.***

Le rapport entre la concentration d'actine filamenteuse et l'actine monomérique varie entre espèces. Il est de 0.1 chez les plantes (Staiger and Blanchoin, 2006), 0.3 dans les extraits d'œufs de xenopes, 1 chez l'amibe et 200 chez la levure (Pollard et al., 2000). Il est cependant important de souligner que l'actine n'existe pas de manière figée sous l'une ou l'autre de ces deux formes, mais est en permanence en équilibre dynamique entre ces deux formes. Cet équilibre est à la base d'une modularité exceptionnelle qui permet aux cellules de réorganiser rapidement leur cytosquelette en réponse à un besoin ou à un signal extracellulaire. Les cellules vivantes dépolymérisent en permanence une partie de leur cytosquelette d'actine pour le repolymériser ailleurs où le besoin se fait. Ce renouvellement est très rapide, généralement entre quelques secondes et quelques minutes (voir Figure 3) (Wang, 1985), (Theriot and Mitchison, 1991).

Le lamellipode est un système qui a été très étudié du fait de sa taille et de sa dynamique très active. Dans ces protrusions, la plupart des filaments d'actine sont orientés avec leur extrémité barbée en direction de la membrane ondulante cellulaire, alors que les extrémités pointues sont dirigées majoritairement vers l'intérieur de la cellule (Symons and Mitchison, 1991). Comme nous le verrons plus tard, les extrémités barbées des filaments d'actine sont les plus dynamiques, et peuvent s'allonger très

rapidement (jusqu'à  $11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , (Pollard, 1986)). Dans le lamellipode, la polymérisation d'un réseau branché dense de filaments d'actine se fait donc au contact de la membrane ondulante. En 1985, Wang a injecté dans le fibroblaste de l'actine marquée à la rhodamine (voir Figure 3A) (Wang, 1985). Le photoblanchiment d'une petite zone (3-4  $\mu\text{m}$ ) du cytosquelette dans le lamellipode de ces cellules lui a alors permis de montrer que le cytosquelette d'actine s'assemble rapidement au contact de la membrane ondulante et se déplace ensuite vers le centre de la cellule à une vitesse de 0.79  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Wang, 1985). Cette étude a permis pour la première fois de proposer que le "treadmilling" de l'actine dans le lamellipode est, directement ou par l'intermédiaire d'autres interactions moléculaires, responsable de la force nécessaire à la protrusion du cytoplasme au niveau de la membrane ondulante (Wang, 1985). En effet, l'élongation des microfilaments au bord cellulaire permettrait de pousser directement la membrane plasmique pour étendre le lamellipode et par la suite de faire avancer la cellule (voir Figure 3). Le renouvellement rapide des filaments d'actine *in vivo* fut confirmé ultérieurement par une autre expérience utilisant de l'actine photoactivable dans le lamellipode de kératocytes de poisson (Theriot and Mitchison, 1991). La fluorescence de l'actine photoactivée reste fixe par rapport au substrat pendant que la cellule se déplace (voir Figure 3B) (Theriot and Mitchison, 1991) et décroît très rapidement en accord avec un renouvellement rapide des filaments d'actine *in vivo*. Ces expériences ont montré que le mouvement des cellules est couplé à une polymérisation extrêmement rapide des filaments d'actine au niveau de la membrane ondulante, les kératocytes de poissons pouvant se déplacer à des vitesses allant jusqu'à 10  $\mu\text{m}/\text{min}$  (environ 3400 sous-unités d'actine/min ; (Pollard et al., 2000)).



**Figure 3: Dynamique cellulaire du cytosquelette d'actine.**

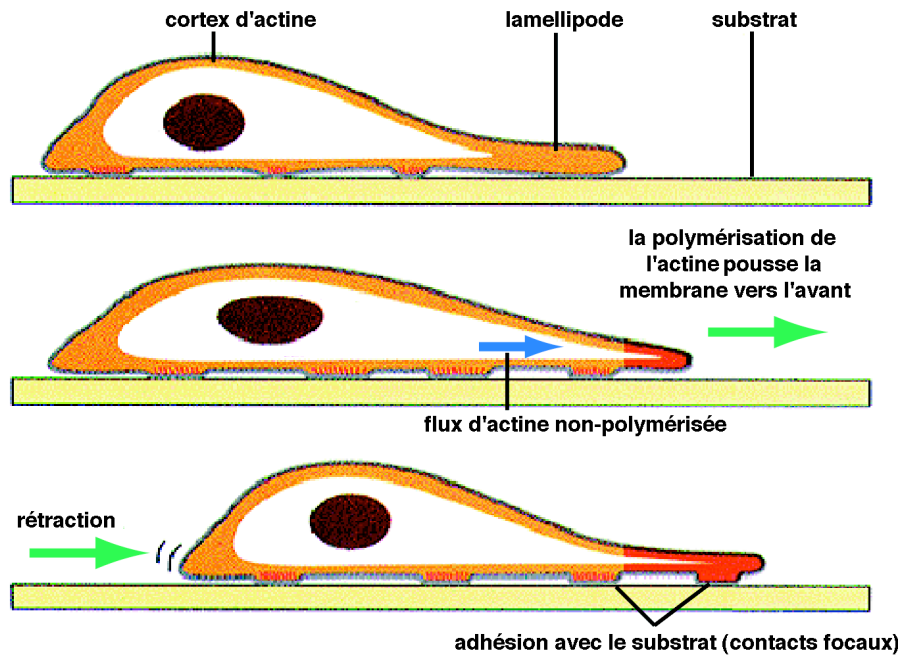
(A) Photoblanchiment d'une petite zone du cytosquelette dans un lamellipode de cellule épithéliale où l'actine est marquée à la rhodamine. Le déplacement de la zone photoblanchie montre le flux d'actine filamenteuse du bord du lamellipode vers l'arrière. Echelle : 5μm. (tiré de (Wang, 1985))

(B) Photoactivation d'une frange du cytosquelette d'actine dans un lamellipode de kératocyte. Les filaments d'actine restent fixes par rapport au substrat alors que le lamellipode continue à avancer, prouvant que la polymérisation de l'actine au bord du lamellipode est responsable de la force de protrusion. Echelle : 5μm. (tiré de (Theriot and Mitchison, 1991)).

A l'arrière du lamellipode maintenant, afin de pouvoir continuellement avancer et renouveler le réservoir d'actine monomérique, la cellule a besoin en revanche de dépolymériser rapidement ce réseau dense. Il y a donc continuellement polymérisation du cytosquelette d'actine à l'avant du lamellipode et dépolymérisation à l'arrière. Ce phénomène est appelé *turnover* du cytosquelette d'actine, et se fait à un rythme extrêmement rapide : le temps moyen que passe une sous-unité d'actine dans un filament est de 23 s (Theriot and Mitchison, 1991).

Il se passe donc dans le lamellipode un phénomène de tapis roulant, où l'actine est recrutée en permanence sous forme monomérique à proximité de la membrane pour polymériser aux extrémités barbées libres des filaments, puis dépolymérisée au fur et à mesure qu'elle retourne vers le cœur de la cellule. Pour engendrer le mouvement cellulaire, ce phénomène doit être coordonné à l'adhésion de la cellule motile avec son substrat et à la rétraction du corps cellulaire (voir Figure 4).





**Figure 4 : Schématisation du mouvement cellulaire.** On distingue plusieurs étapes :  
1/ Extension de la membrane sur le bord avant de la cellule grâce à la polymérisation contrôlée de l'actine ;  
2/ Adhésion de la membrane au substrat par création de points focaux ;  
3/ Détachement des points focaux à l'arrière de la cellule et rétraction de la membrane et du corps cellulaire.

## **II Dynamique de l'actine *in vitro* et rôle des ABPs sur la régulation de la dynamique du cytosquelette et sa structuration.**

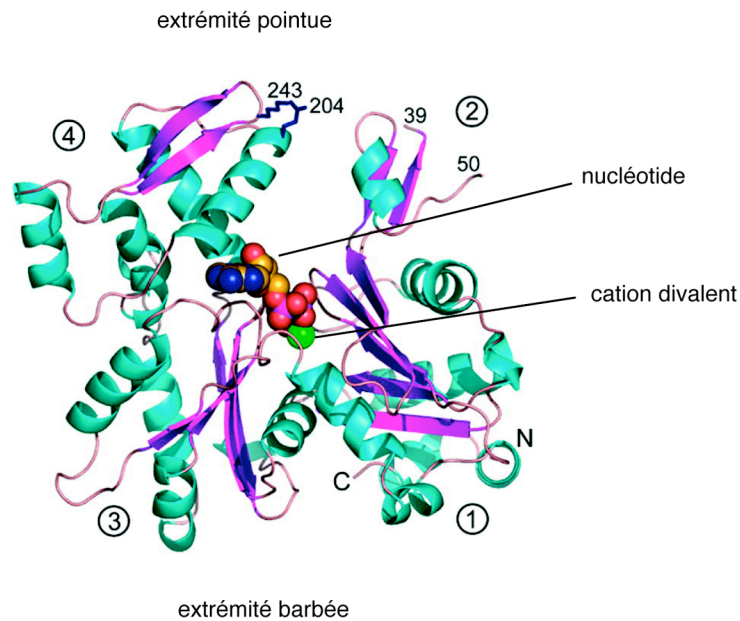
### ***II-1/ L'actine in vitro, sa dynamique intrinsèque.***

#### **II-1-1/ Base structurale du monomère et du filament d'actine.**

L'actine monomérique est une protéine globulaire d'environ 55 Å de diamètre, exprimée en très grande quantité dans les cellules eucaryotes (voir Figure 5). Découverte par Straub dans les années 40 (Straub, 1942), l'actine est une protéine fondamentale des cellules musculaires et des cellules non musculaires, dans lesquelles sa concentration cytosolique peut atteindre des concentrations aussi élevée que 0.5 mM.

La masse molaire d'un monomère d'actine est d'environ 43 kDa et les séquences des gènes codant pour l'actine sont conservées à 80 pourcent entre les espèces. Certaines espèces possèdent plusieurs isoformes d'actine, que l'on retrouve dans différentes structures filamenteuses. Par exemple, l'homme possède 6 isoformes d'actine, dont les séquences sont identiques à 95%.

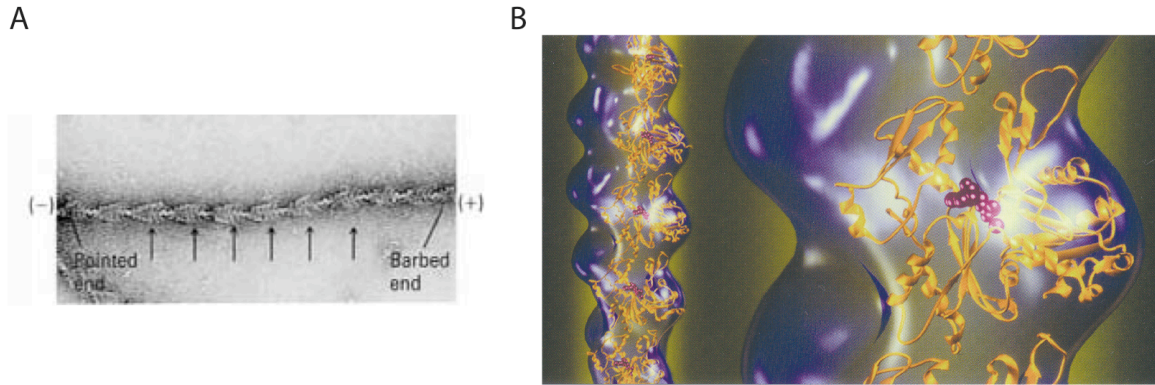
La structure du monomère d'actine apparaît particulièrement bien conservée entre espèces (Kabsch et al., 1990), (Rould et al., 2006). L'analyse cristallographique indique que la protéine est séparée en deux domaines par un sillon à l'intérieur duquel peuvent se fixer avec une forte affinité un cation divalent calcium ou magnésium et un nucléotide ATP ou ADP (voir Figure 5). Ces deux domaines sont eux-mêmes divisés en deux sous-domaines (Kabsch et al., 1990). Il est généralement admis que dans les cellules, le monomère d'actine est associé à un cation  $Mg^{2+}$ , et la majorité de l'actine monomérique se trouve liée à un ATP. Les différences structurales entre les monomères d'actine liés à l'ATP ou à l'ADP semblent mineures (Sablin et al., 2002), (Rould et al., 2006). Il en découle une des grandes énigmes structurales du monomère d'actine quant à sa sélectivité envers ses partenaires protéiques. En effet, par exemple la thymosine-β4 se lie avec une affinité 100 fois plus faible à un monomère lié à l'ADP par rapport à un monomère lié à l'ATP (Jean et al., 1994). Une des hypothèses avancées pour expliquer cette différence repose sur une structure plus ouverte du monomère d'actine-ADP par rapport au monomère d'actine-ATP, contrôlée par la présence du phosphate  $\gamma$  au niveau de la poche nucléotidique (Sablin et al., 2002).



**Figure 5 : Structure atomique de l'actine obtenue à partir du spectre de diffraction aux rayons X de la protéine non polymérisable.** Les chiffres de 1 à 4 indiquent les sous-domaines (ou lobes) de l'actine. Entre le sous-domaine 2 et le sous-domaine 4 se trouve le sillon au fond duquel se trouvent le nucléotide et le cation divalent. (tiré de (Rould et al., 2006)).

Les bases géométriques du filament d'actine sont connues depuis plusieurs années grâce à des études de diffraction des rayons X sur le muscle squelettique (Huxley, 1963), (Huxley, 1968) ou sur des gels d'actine orientés (Popp et al., 1987), (Popp and Holmes, 1992). Grâce à la microscopie électronique, il a été possible d'établir des modèles structuraux du filament d'actine (Holmes et al., 1990). Le filament d'actine se présente sous la forme d'une double hélice avec un diamètre d'environ 7 nm. Chaque sous-unité à l'intérieur du filament est en contact avec 4 autres sous-unités. On distingue 2 contacts latéraux avec les 2 sous unités les plus proches du brin voisin et 2 contacts longitudinaux avec les 2 sous unités voisines du même brin (Holmes et al., 1990). Le pas de cette double hélice est de 71,5 nm avec 13 sous-unités par tour d'hélice. Le filament d'actine est polarisé, on distingue l'extrémité barbée de l'extrémité pointue. Cette appellation "barbée, pointue" repose sur l'apparence en tête de flèche des filaments d'actine décorés par le sous-fragment 1 de la myosine et observés en microscopie électronique (voir Figure 6) (Milligan et al., 1990). L'extrémité pointue des filaments d'actine correspond à l'extrémité du filament où le sillon des deux dernières sous-unités est exposé à la solution.





**Figure 6: Structure d'un filament d'actine.**

(A) Cliché en microscopie électronique d'un filament d'actine décoré de têtes de myosines. L'extrémité qui apparaît "en brosse" est appelée extrémité barbée, et l'extrémité qui apparaît en pointe de flèche est appelée extrémité pointue (cliché de M. Runge).

(B) Reconstitution en faible résolution de la structure à 3 dimensions d'un filament d'actine en superposant la structure atomique de l'actine avec la structure du filament obtenue en microscopie électronique (structure de U. Aebi).

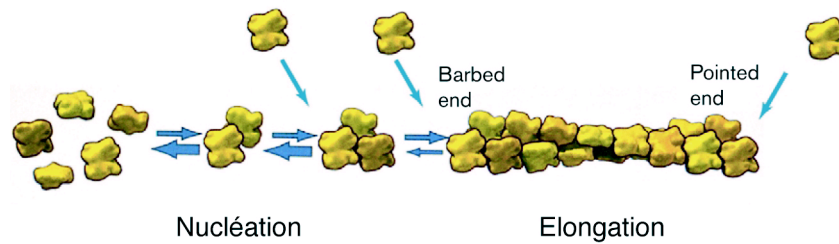
## II-1-2/ Les trois phases de la polymérisation de l'actine *in vitro*.

A des concentrations faibles en sel (typiquement 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ), l'actine se trouve à l'équilibre sous forme monomérique. Lorsque la concentration en sels augmente jusqu'à des concentrations comparables aux concentrations physiologiques (typiquement 50 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), l'équilibre est rompu et la polymérisation de l'actine s'amorce. La réaction de polymérisation de l'actine *in vitro* est classiquement décomposée en trois phases.

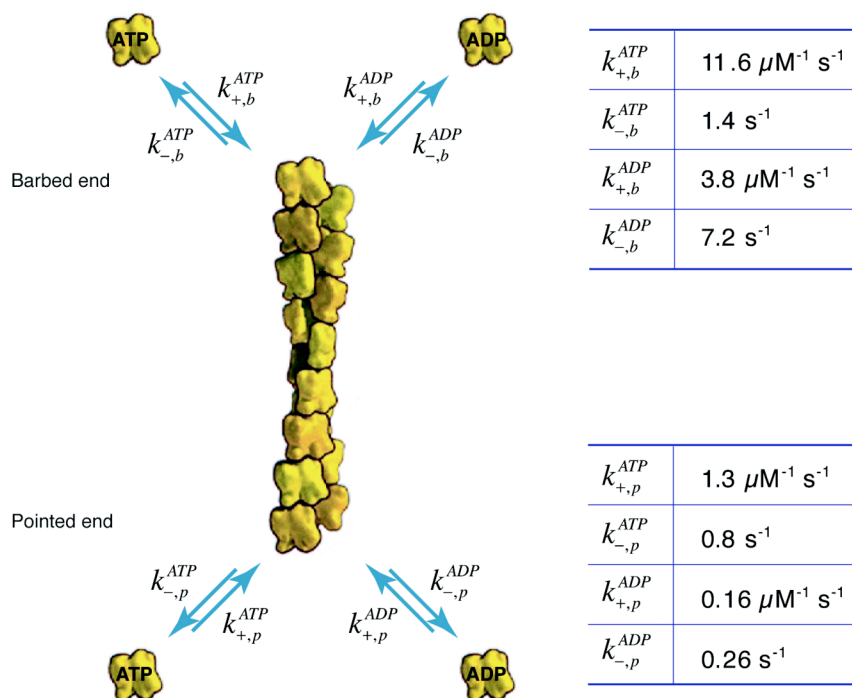
Dans une première phase, dite phase de nucléation, les monomères d'actine s'auto-assemblent d'abord sous forme d'oligomères thermodynamiquement instables. Dès que les oligomères dépassent la taille d'un trimère, ils adoptent une conformation hélicoïdale, deviennent thermodynamiquement stables, et la réaction de polymérisation peut s'engager aux deux extrémités du filament d'actine si la concentration d'actine monomérique dépasse la concentration critique d'assemblage ( $c_{c,a} = k_-/k_+$ ) (voir Figures 7 et 9). Cette première étape correspond donc à une étape cinétiquement limitante de la réaction de polymérisation.

Dans une deuxième phase, dite phase d'élongation, les monomères d'actine polymérisent aux extrémités barbées ou pointues des filaments d'actine par le biais d'une réaction bimoléculaire (voir Figures 7, 8 et 9). Les microfilaments d'actine étant des filaments polaires, les cinétiques d'assemblage et de dissociation des sous-unités d'actine dépendent de la nature des extrémités, pointues ou barbées. La nature du cation divalent et du nucléotide modifie la conformation de la protéine et change dramatiquement les propriétés du monomère et du filament. Les paramètres cinétiques d'assemblage et de

dissociation des sous-unités d'actine aux extrémités barbées et pointues sont donc aussi affectés par la nature du cation et du nucléotide. La Figure 8 donne toutes les valeurs connues des constantes d'association ( $k_+$ ,  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) et de dissociation ( $k_-$ ,  $\text{s}^{-1}$ ) de l'actine monomérique pour les deux extrémités du filament suivant la nature du nucléotide.



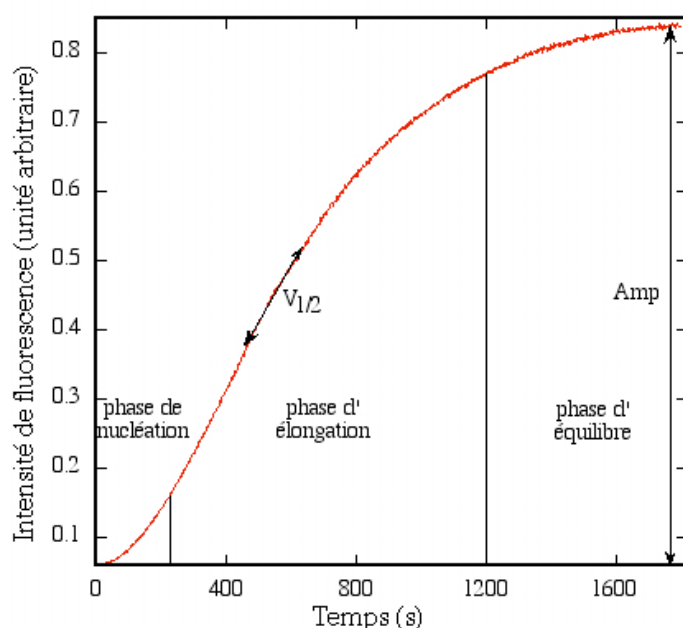
**Figure 7 : Mécanisme de formation des filaments d'actine.** L'actine passe par deux états dimériques et trimériques linéaires instables avant de former des filaments hélicoïdaux stables et pouvant s'allonger.



**Figure 8 : Constantes d'association et de dissociation de l'actine ATP et ADP aux deux extrémités du filament d'actine.** (tiré de (Pollard, 1986)) Seule l'insertion de sous-unités d'actine-ATP à l'extrémité barbée se fait à une vitesse rapide et limitée par la diffusion (Drenckhahn and Pollard, 1986).

Dans une troisième phase, dite phase d'équilibre, l'actine arrive à un état stationnaire entre ses deux formes monomérique et filamenteuse (voir Figure 9). L'actine existe alors sous sa forme monomérique à une concentration égale à sa concentration critique d'assemblage, le reste de l'actine étant sous forme filamenteuse.

Les cinétiques de polymérisation de l'actine sont généralement étudiées en spectrofluorimétrie grâce à un marquage de l'actine sur sa cystéine 374 à l'aide d'une sonde fluorescente, le (1 N-(1-pyrène)iodoacetamide) (Kouyama and Mihashi, 1981), (Cooper et al., 1983) (voir Figure 9). Le pyrène est peu exposé quand l'actine est sous sa forme monomérique, et au cours de la réaction de polymérisation, l'actine subit un changement de conformation qui expose cette sonde fluorescente. La réaction de polymérisation peut donc être suivie quantitativement en mesurant le signal de fluorescence du pyrène au cours du temps. Cette augmentation de fluorescence est directement proportionnelle à la concentration de polymère générée au cours de la réaction de polymérisation.



**Figure 9 : Cinétique de polymérisation de l'actine marquée au pyrène.** La réaction chimique se décompose en 3 phases. La phase de nucléation, avec une polymérisation lente, correspond à la période pendant laquelle se forme de nombreux noyaux stables d'actine. La présence d'un nombre suffisant de noyaux pouvant s'allonger entraîne une phase de polymérisation rapide appelée phase d'élongation. Enfin, la réaction atteint une phase d'équilibre stationnaire dès lors que le réservoir d'actine monomérique est consommé.

### **II-1-3/ L'hydrolyse du nucléotide influence la dynamique d'assemblage des filaments d'actine.**

Au cours de l'assemblage des filaments d'actine réalisé en présence d'ATP, le nucléotide ATP lié à la sous-unité d'actine dans le filament peut s'hydrolyser rapidement sous la forme ADP-Pi, puis le phosphate inorganique Pi peut se dissocier (voir Table 1). Contrairement à l'actine monomérique, l'actine filamenteuse ne peut pas échanger son

nucléotide. Ainsi, les sous-unités d'actine à l'intérieur d'un filament évoluent toutes d'un état ATP vers un état ADP, mais jamais l'inverse. Nous verrons pourquoi ce processus d'hydrolyse est fondamental pour comprendre les processus dynamiques mettant en jeu la polymérisation de l'actine.

k (hydrolyse ATP)	0.35 s <sup>-1</sup>
k (dissociation Pi)	0.0019 s <sup>-1</sup>

**Table 1 : Constantes d'hydrolyse de l'ATP et de dissociation du phosphate de sous-unités de filament d'actine.** (tiré de (Blanchoin and Pollard, 2002) et (Carlier and Pantaloni, 1986)).

Bien que la vitesse moyenne d'hydrolyse du nucléotide dans les filaments d'actine soit connue, le mécanisme par lequel se fait cette hydrolyse est toujours controversé. Deux modèles sont proposés. Dans un premier modèle, appelé modèle "d'hydrolyse vectorielle" (Carlier and Pantaloni, 1986), (Korn et al., 1987), l'hydrolyse de l'ATP se fait préférentiellement pour les sous-unités d'actine-ATP voisines de sous-unités ADP-Pi. En d'autres termes, l'hydrolyse d'une sous-unité d'actine influence l'hydrolyse de la sous-unité voisine. Par conséquent, les filaments d'actine peuvent être donc divisés en deux zones, suivant qu'ils viennent d'être polymérisés (leur nucléotide sera alors ATP ou ADP-Pi), ou suivant qu'ils soient plus vieux (ils seront alors ADP). Un deuxième modèle, appelé modèle "d'hydrolyse aléatoire" (Pieper and Wegner, 1996), propose que l'hydrolyse des sous-unités d'actine dans un filament se fasse de manière non coordonnée, c'est-à-dire que l'hydrolyse d'une sous-unité se fasse indépendamment de la nature des sous-unités voisines. Il est toutefois important de noter qu'un processus aléatoire d'hydrolyse du nucléotide sera influencé par le temps de résidence d'une sous-unité dans le filament d'actine. En effet, les sous-unités les plus anciennement polymérisés ont une probabilité plus grande d'avoir leur nucléotide sous la forme ADP.

#### II-1-4/ Le "turnover simple" des filaments d'actine ou "treadmilling".

Le processus d'hydrolyse du nucléotide joue un rôle double. Tout d'abord, la cinétique d'hydrolyse du nucléotide joue le rôle d'horloge interne du filament d'actine et permet de caractériser "l'âge" d'un filament d'actine. D'après les constantes cinétiques d'hydrolyse et de dissociation du phosphate, tout filament plus jeune que 3 s sera composé majoritairement de sous-unités ATP-actine, tout filament existant depuis plus de 3 s mais moins de 530 s sera majoritairement ADP-Pi, et enfin tout filament plus vieux que 530 s sera majoritairement ADP.

A l'état stationnaire, la plupart des filaments d'actine auront donc une extrémité barbée composée d'au moins quelques sous-unités d'actine-ATP, alors que les extrémités pointues des filaments d'actine auront majoritairement des sous-unités ADP. L'hydrolyse de l'ATP permet donc de créer une asymétrie supplémentaire entre les extrémités barbées et pointues conférant aux filaments d'actine des propriétés particulières supplémentaires.

A l'extrémité barbée du filament, la concentration critique est de

$$c_{c,b} = \frac{k_{-,b}^{ATP}}{k_{+,b}^{ATP}} = \frac{1.4}{11.6} = 0.12 \mu M \quad (1)$$

alors qu'à l'extrémité pointue, la concentration critique est de

$$c_{c,p} = \frac{k_{-,p}^{ATP}}{k_{+,p}^{ATP}} = \frac{0.8}{1.3} = 0.62 \mu M \quad (2)$$

A l'équilibre, la concentration d'actine monomérique, qui sera égale à la concentration critique d'assemblage, aura une valeur intermédiaire entre les valeurs des concentrations critiques aux extrémités barbées et pointues. Et sa valeur est donnée par l'équation:

$$v_{pol}(c_{c,a}) = 0 \quad (3)$$

or :

$$v_{pol}(c) = k_{+,b}^{ATP}(c - c_{c,b}) + k_{+,p}^{ATP}(c - c_{c,p})$$

d'où :

$$c_{c,a} = \frac{k_{-,b}^{ATP} + k_{-,p}^{ATP}}{k_{+,b}^{ATP} + k_{+,p}^{ATP}} = 0.17 \mu M \quad (4)$$

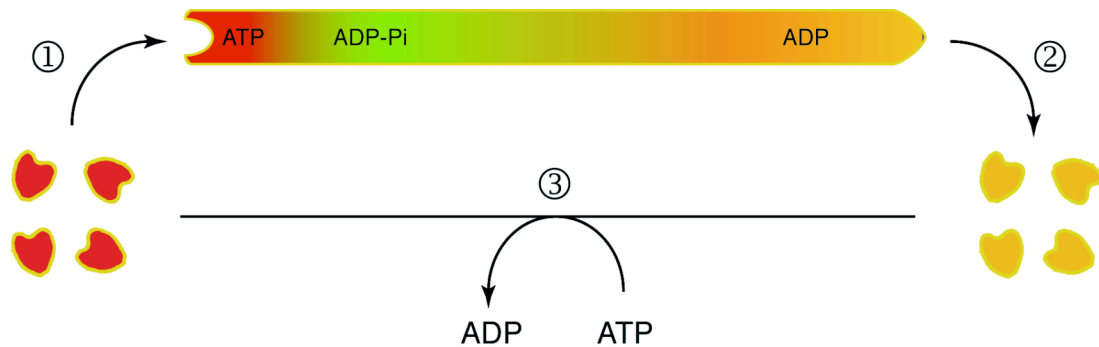
A l'extrémité barbée des filaments d'actine, la concentration d'actine monomérique sera toujours supérieure à la concentration critique à l'extrémité barbée ( $c_{c,a} > c_{c,b}$ ), donc il y a un ajout de monomère à cette extrémité à la vitesse moyenne:

$$v_{pol,b} = k_{+,b}(c_{c,b} - c_{c,a}) = 0.58 s^{-1} \quad (5)$$

alors qu'à l'extrémité pointue des filaments, la concentration d'actine monomérique sera toujours inférieure à la concentration critique à l'extrémité pointue  $c_{c,a} < c_{c,p}$ , donc il y a une perte de sous-unité à cette extrémité à la vitesse moyenne :

$$v_{pol,p} = k_{+,p}(c_{c,p} - c_{c,a}) = -0.58 s^{-1} \quad (6)$$

Ce phénomène particulier de polymérisation à une extrémité et dépolymérisation à l'autre extrémité est appelé "turnover simple" des filaments d'actine ou "treadmilling" (voir Figure 10). Il est limité par la valeur de  $c_{c,a}$  qui elle-même est limitée par les constantes de vitesse d'assemblage de l'actine.



**Figure 10 : Phénomène cyclique de treadmilling de l'actine.** Les sous-unités d'actine-ATP (en rouge) s'ajoutent aux extrémités barbées des filaments. Le nucléotide de la sous-unité s'hydrolyse progressivement, passant successivement dans un état ADP-Pi (en vert), puis ADP (en jaune). Les sous-unités d'actine-ADP dépolymérisent à l'extrémité pointue des filaments, échangent leur nucléotide, et redeviennent disponibles pour polymériser. Cette réaction est lente *in vitro* car limitée par la vitesse de dissociation des sous-unités d'actine-ADP ( $k_- = 0.27s^{-1}$ ).

## II-2/ Contrôle de la dynamique de l'actine.

### II-2-1/ Des protéines régulatrices pour un cytosquelette organisé et dynamique.

Afin de pouvoir répondre à un besoin immédiat ou à un signal extracellulaire, les cellules eucaryotes doivent être capables de contrôler en permanence et rapidement l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine. Comme nous venons de le voir, la polymérisation de l'actine seule *in vitro* pendant le *treadmilling* est extrêmement lente car limitée par la vitesse de dissociation des sous-unités d'actine-ADP ( $k_- = 0.27s^{-1}$ ). Elle ne peut donc expliquer à elle seule la plupart des phénomènes dynamiques observés à l'échelle cellulaire, que ce soient les vitesses de déplacement des cellules et organelles, la vitesse du *turnover* mesurée *in vivo*, la présence de structures organisées de filaments d'actine, ou le maintien par la cellule d'une concentration cytosolique d'actine monomérique élevée (on estime que seulement la moitié de l'actine est polymérisée en moyenne dans le cytoplasme des cellules au repos). Parce que la présence seule d'actine dans la cellule ne pourrait suffire, la cellule a à sa disposition un grand nombre de protéines particulières, les ABPs (pour Actin Binding Proteins), que l'on regroupe généralement en familles de protéines de séquences et de fonctions voisines (Pollard et al., 2000). Ces protéines interagissent directement avec l'actine et peuvent d'une manière ou d'une autre modifier les propriétés dynamiques et/ou structurales du cytosquelette d'actine.

On peut regrouper les ABPs suivant leur rôle sur le contrôle de la dynamique et de l'organisation des filaments d'actine. Cependant, certaines ABPs peuvent contrôler simultanément plusieurs aspects de cette dynamique. Les ABPs peuvent donc :

- 1) Maintenir une concentration élevée d'actine monomérique nécessaire au renouvellement rapide des filaments d'actine.
- 2) Nucléer (ou initier) des filaments d'actine.
- 3) Dépolymériser les filaments d'actine.
- 4) Organiser les filaments d'actine en structures élaborées.

Parmi plus de 60 familles de protéines interagissant avec l'actine nous nous intéresserons à un petit nombre qui a été montré comme nécessaire et suffisant à la reconstitution efficace *in vitro* de la dynamique rapide des filaments d'actine et à la génération de force qui en découle (voir partie III et (Loisel et al., 1999)). Ces protéines sont, la profiline, les protéines de coiffes, les facteurs de nucléations (complexe Arp2/3 et formines), et les facteurs de dépolymérisation (ADF/cofiline).

## ***II-3/ Caractéristiques des principales ABPs.***

### **II-3-1/ La profiline.**

La profiline est dans de nombreux organismes et dans la plupart des types cellulaires la protéine interagissant avec l'actine la plus abondante (Pollard et al., 2000). Cette petite protéine de 14kDa peut être présente dans le cytoplasme jusqu'à des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  ; ainsi, *in vivo*, l'actine monomérique se trouve le plus souvent complexée à la profiline. La profiline se lie sur la face barbée des monomères d'actine (Schutt et al., 1993). La profiline interagit plus fortement avec l'actine-ATP ( $K_d = 0.1 - 0.5 \mu\text{M}$ ) qu'avec l'actine-ADP ( $K_d = 0.5 - 2 \mu\text{M}$ ) (Vinson et al., 1998), et sauf dans le cas particulier des profilines de plante, accélère l'échange du nucléotide ADP pour un nucléotide ATP (Perelroizen et al., 1996), (Vinson et al., 1998).

Les monomères d'actine complexés à la profiline peuvent s'ajouter uniquement aux extrémités barbées libres des filaments d'actine à la même vitesse que des monomères seuls, mais la profiline ne peut pas rester complexée aux sous-unités d'actine dans le filament. Le mécanisme de dissociation de la profiline liée à la sous-unité d'actine à l'extrémité barbée du filament d'actine est sujet à controverse. Un premier groupe a montré que la dissociation de la profiline est couplée avec l'hydrolyse du nucléotide et la dissociation du phosphate (Gutsche-Perelroizen et al., 1999), (Perelroizen et al., 1996). Un tel modèle implique donc que toute l'actine filamenteuse polymérisée en présence de profiline, comme c'est le cas dans la cellule, se trouve uniquement sous forme ADP. L'état du nucléotide ne peut donc plus jouer le rôle

d'horloge interne du filament d'actine. A l'inverse, une autre étude réalisée avec de l'actine-Mg a montré que la dissociation de la profiline n'est pas couplée avec l'hydrolyse du nucléotide (Blanchoin and Pollard, 2002), et doit reposer sur un changement de conformation de la sous-unité d'actine après son intégration dans le filament.

Les monomères d'actine complexés à la profiline ne peuvent plus s'ajouter aux extrémités pointues des filaments d'actine (Pollard and Cooper, 1984). De plus, la présence de profiline inhibe totalement la formation d'oligomères thermodynamiquement stables et capables de s'allonger. Grâce à cette propriété, la profiline empêche totalement la nucléation spontanée de filaments d'actine dans les cellules. Une autre propriété fondamentale de la profiline est d'interagir avec les protéines ayant des domaines poly-proline. *In vitro*, la profiline interagit de façon optimale avec des séquences d'une dizaine de proline successives ( $K_d \approx 10 - 50 \mu\text{M}$ ) (Perelroizen et al., 1994), (Petrella et al., 1996).

### II-3-2/ Les protéines de coiffe.

Comme nous venons de le voir, la présence de la profiline ne permet pas aux cellules eucaryotes de maintenir une concentration élevée d'actine monomérique, car la profiline permet l'addition des monomères d'actine aux nombreuses extrémités barbées libres de filaments présentes dans la cellule. Pour limiter la déplétion trop rapide de ce réservoir d'actine monomérique liée à la profiline, la cellule dispose de protéines de coiffe qui vont interagir fortement avec les extrémités barbées des filaments (Schafer and Cooper, 1995), (Rogers et al., 2003). Ainsi, en maintenant la plupart des extrémités barbées des filaments bloqués, la cellule va pouvoir à la fois s'assurer de la présence d'une grande quantité d'actine monomérique et contrôler localement la polymérisation du cytosquelette d'actine (Rogers et al., 2003).

On distingue habituellement plusieurs familles de protéines de coiffe ayant toutes une très forte affinité pour les extrémités barbées des filaments d'actine ( $K_d$  variant de  $10^{-2}$  nM à quelques nM). Une première famille de protéines de coiffe, la famille des "capping proteins" (CP), est un hétérodimère  $\alpha\beta$ , avec une sous-unité  $\alpha$  de 32-36 kDa, et une sous-unité  $\beta$  de 28-32 kDa. Les "capping proteins" interagissent avec les extrémités barbées avec une affinité de l'ordre du nM. *In vivo*, la concentration de capping protein très élevée (de l'ordre du  $\mu\text{M}$  chez les vertébrés (Cooper and Schafer, 2000)) est régulée directement ou indirectement par de nombreuses molécules. En particulier à la membrane, la présence de Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PtIns[4,5]P<sub>2</sub>) inhibe l'activité des protéines de coiffe pour permettre la polymérisation de l'actine à la membrane (Schafer et al., 1996), (Iwasa and Mullins, 2007).



Deux autres familles particulières de protéines peuvent coiffer les extrémités barbées des filaments d'actine, les gelsolines et les villines. La séquence de ces deux protéines a révélé la présence de six domaines homologues de 100 à 120 acides aminés, appelés domaines gelsoline (gelsolin-like domains), possédant tous une structure très voisine (Burtnick et al., 1997). En plus de ces six domaines, la villine possède un domaine supplémentaire dans la région C-terminale, appelé tête (villin headpiece). Ces deux familles de protéine se distinguent des autres protéines de coiffe par des propriétés additionnelles particulières. Elles ont la possibilité de lier le côté des filaments d'actine avec une forte affinité et de fragmenter les filaments, en restant attachées aux extrémités barbées produites par la coupure (Way et al., 1989). En plus de cela, la villine peut organiser les filaments en faisceaux parallèles. L'activité de la gelsoline et de la villine est fortement dépendante de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , et l'interaction directe du calcium est nécessaire pour l'activation de ces protéines (Kinosian et al., 1998), (Kumar et al., 2004).

### **II-3-3/ Les facteurs de nucléation de l'actine.**

Nous avons vu que le maintien d'une forte concentration d'actine monomérique dans le cytoplasme résulte de l'effet synergétique d'une protéine interagissant avec les monomères d'actine et d'une protéine interagissant avec les extrémités barbées des filaments d'actine. Pour permettre la polymérisation contrôlée des filaments d'actine, les cellules eucaryotes doivent donc maîtriser spatialement et temporellement l'utilisation de cette réserve d'actine monomérique et contrôler l'apparition et la coiffe de nouvelles extrémités barbées. La formation d'un nouveau filament ne peut s'effectuer spontanément au sein de la cellule, puisque le plus souvent la totalité des monomères d'actine sont complexés à la profiline qui inhibe la nucléation spontanée de nouveaux filaments. Toute nouvelle extrémité barbée peut être initiée de 3 manières différentes : soit par 1/ la coupe d'un filament préformé, soit par 2/ la libération d'une extrémité protégée par une protéine de coiffe, soit par 3/ la nucléation d'un nouveau filament d'actine à partir d'un facteur de nucléation.

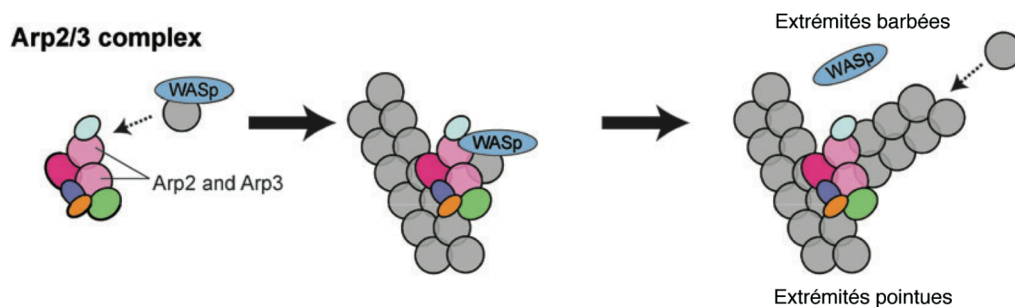
Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé au troisième mécanisme. A ce jour, seuls trois nucléateurs de l'actine sont connus : le complexe Arp 2/3, la famille des formines et Spire.

#### **II-3-3-1/ Le complexe Arp 2/3.**

Le premier nucléateur de l'actine découvert est le complexe Arp2/3 (Machesky et al., 1994). Le complexe Arp2/3 est un complexe stable et abondant impliqué dans de

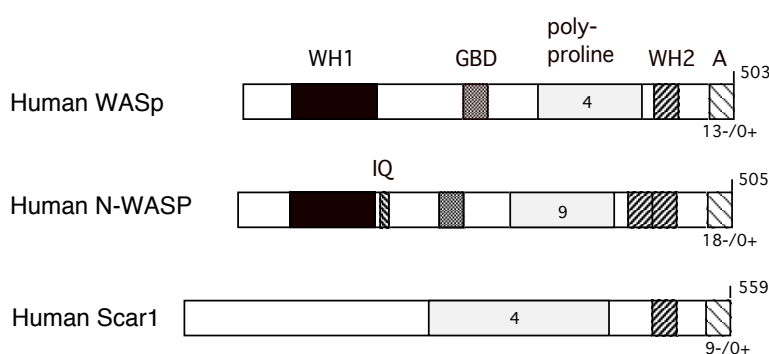
nombreuses fonctions cellulaires essentielles, telles que la motilité cellulaire et l'endocytose. En particulier lors de la protrusion du lamellipode, le complexe Arp2/3 est responsable de la formation des réseaux branchés de filaments d'actine (Svitkina and Borisy, 1999b), (Mullins et al., 1998).

Le complexe Arp2/3 possède donc simultanément deux propriétés particulières. Tout d'abord, il permet la nucléation efficace de filaments d'actine sur le côté d'un filament préexistant (Blanchoin et al., 2000a). En effet, le complexe Arp2/3 se fixe à l'extrémité pointue du filament nouvellement nucléé, et laisse son extrémité barbée libre de s'allonger (Mullins et al., 1998). Simultanément, le complexe Arp2/3 joue un rôle direct dans la réticulation des filaments d'actine. Il peut brancher le filament nouvellement formé (appelé filament fille) sur un filament préexistant (appelé filament mère), avec un angle de 70° (Mullins et al., 1998), (Blanchoin et al., 2000a), (Amann and Pollard, 2001), les deux extrémités barbées pointant dans la même direction (voir Figure 11). Le complexe Arp2/3 est composé de sept sous-unités dont 2 sont des Arps (Actin Related Proteins) (Machesky et al., 1994). La résolution de la structure du complexe Arp2/3 a confirmé que les deux sous-unités (Arp2 et Arp3) ont des structures très proches de la structure de l'actine (Robinson et al., 2001). La formation du complexe permet de rapprocher les deux sous-unités Arp2 et Arp3 et de leur donner une orientation voisine. Ce résultat, combiné avec d'autres données biochimiques, laisse à croire qu'Arp2 et Arp3 correspondent à un noyau dimérique stable favorisant la formation du filament fille. Le mécanisme de formation des branches reste à l'heure actuelle l'objet d'un débat. Un premier groupe propose que le complexe Arp2/3 interagit avec l'extrémité barbée du filament mère d'actine, et s'insère par la suite dans le filament mère (Boujemaa\_Paterski et al., 2001). La nucléation du filament fille se produit instantanément si bien que le filament mère et le filament fille doivent avoir la même longueur (Boujemaa\_Paterski et al., 2001), (Pantaloni et al., 2001). Un autre groupe a montré que le complexe Arp2/3 peut se brancher directement sur le côté du filament mère, induisant ainsi la formation d'un filament fille pouvant être plus court que le filament mère (Blanchoin et al., 2000a), (Amann and Pollard, 2001). L'utilisation de la microscopie à onde évanescente a permis de visualiser directement la formation de branches sur le côté d'un filament préexistant (Amann and Pollard, 2001). Un modèle basé sur un branchement sur le côté du filament d'actine contrôlé par le nucléotide lié au filament mère permet de réconcilier en partie les deux modèles (Carlsson et al., 2004).



**Figure 11 : Schématisation du mécanisme de nucléation du complexe Arp2/3.** Le complexe Arp2/3 activé par les protéines de la famille WASp/Scar forme une branche sur le côté d'un filament préexistant. Les deux filaments forment un angle de 70° et les deux extrémités barbées pointent dans la même direction. (tiré de (Goode and Eck, 2007)).

Alors que le premier modèle permet d'expliquer directement comment la cellule forme des réseaux de filaments de longueurs équivalentes, le deuxième modèle suppose un mécanisme plus complexe de régulation de la formation des branches, en particulier par une activation localisée du complexe Arp2/3. En effet, le complexe Arp2/3 par lui-même a une très faible activité de nucléation (Mullins et al., 1998), et la nucléation efficace de l'actine par le complexe Arp2/3 requiert la présence d'un activateur. Parmi les activateurs connus du complexe Arp2/3, on trouve la protéine ActA responsable de la propulsion de *Listeria monocytogenes* (Welch et al., 1998), et les protéines de la famille WASp/Scar (Wiskott-Aldrich Syndrome proteins, (Machesky and Insall, 1998), (Machesky et al., 1999)). La famille WASp/Scar chez les mammifères est composée de 5 membres: WASp (qui n'est présente que dans les cellules hématopoïétiques, et dont les mutations sont responsables du syndrome de Wiskott-Aldrich), N-WASp (l'homologue ubiquitaire de WASp), et 3 isoformes de Scar (voir Figure 12).



**Figure 12 : Différents domaines des protéines de la famille Wasp/Scar.**

La présence de filaments d'actine augmente aussi l'activité de nucléation du complexe Arp2/3 (Machesky et al., 1999). Tout cela suggère un mécanisme d'activation du complexe Arp2/3 extrêmement complexe est finement régulé, avec une réaction transitoire tri-moléculaire, où se forme pendant un bref instant un complexe activateur-Arp2/3-filament mère (Martin et al., 2006). A ce système complexe d'activation s'ajoute

le rôle du nucléotide lié aux deux Arps du complexe Arp2/3 (Martin et al., 2005), (Dayel and Mullins, 2004), (Le Clainche et al., 2001), le but ultime étant de coordonner nucléation et formation de réseau dendritique (Mullins et al., 1998), (Svitkina and Borisy, 1999a).

### ***II-3-3-2/ La famille des formines.***

#### ***II-3-3-2-a/ Fonctions des formines.***

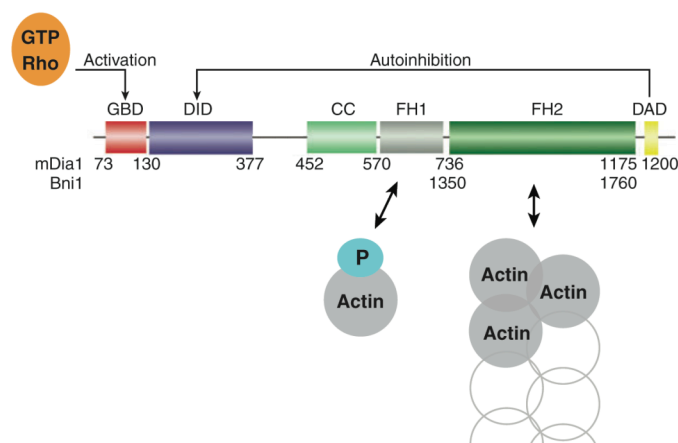
En 1994, Castrillon et Wasserman ont montré que le gène *diaphanous* est nécessaire à la cytokinèse (Castrillon and Wasserman, 1994). La protéine codée par ce gène contient deux domaines que l'on retrouve en position C-terminale des protéines de la famille des formines, codées par le gène *limb deformity* chez la souris (Mass et al., 1990). Ces deux domaines ont été appelés FH1 et FH2 (pour Formin Homology domain 1 et 2) (Castrillon and Wasserman, 1994). Ces deux domaines se retrouvent dans la protéine Bni1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Castrillon and Wasserman, 1994). Par la suite, le lien entre les formines et le cytosquelette d'actine a été démontré chez la levure (Sagot et al., 2002a), (Evangelista et al., 2002). Rapidement après cette première observation, les formines ont été identifiées comme des facteurs de nucléation de l'actine (Sagot et al., 2002b), (Pruyne et al., 2002).

#### ***II-3-3-2-b/ La famille des formines et domaines conservés.***

L'étude des bases de données a montré que la plupart des eucaryotes possèdent plusieurs représentants de la famille des formines (Higgs and Peterson, 2005). A l'origine, une séquence d'une centaine d'acides aminés très conservée fut identifiée dans le domaine FH2 et servit à définir la famille des formines. Par la suite, la taille de cette séquence a été augmentée jusqu'à environ 400 acides aminés qui semblent définir le domaine entier. Le domaine FH2 est le domaine directement responsable de l'interaction avec l'actine. Des études phylogénétiques ont montré que les formines pouvaient être divisées en 7 groupes : les formines Dia (*Diaphanous*), les formines DAAM (*Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis*), les formines FRL (*Formin-Related genes in Leucocytes*), les formines FHOD (*Formin Homology Domain Containing Protein*), les formines INF (*Inverted Formin*), les formines FMN (*ForMiNes*) et les delphelines (Higgs and Peterson, 2005).

Une analyse détaillée de la séquence des formines a prédit la présence de plusieurs autres domaines au voisinage du domaine FH2, formant au final des protéines entières dont la taille varie de 1000 à 2000 acides aminés (voir Figure 13). Parmi ces

autres domaines responsables de l'activité ou de la régulation des formines, le domaine FH1 est un domaine spécifique riche en prolines, susceptibles d'interagir avec la profiline. Au sein d'un domaine FH1, les prolines sont généralement organisées en courtes séquences d'une dizaine de prolines. La longueur du domaine FH1 est variable, sa taille pouvant aller jusqu'à 250 paires de bases, et le nombre de séquences et l'espacement entre séquences de proline est variable (Higgs, 2005). Le domaine FH1 est rarement absent des formines (sauf cas particulier chez certaines espèces comme *Arabidopsis thaliana* (Cvrckova, 2000)), et se trouve généralement à proximité du domaine FH2 en position N-terminale (voir Figure 13). La plupart des formines possèdent en plus deux domaines appelés DID (Diaphanous Inhibitory Domain) et DAD (Diaphanous Auto-regulatory Domain). Ces domaines, respectivement situés dans les régions N- et C-terminales de la protéine entière, sont responsables de l'autorégulation des formines (Li and Higgs, 2005) (voir Figure 13). En interagissant entre eux, ils provoquent le repliement de la protéine dans une conformation inactive. Aucun mécanisme de régulation n'est connu pour les formines ne possédant pas de domaine DID ou DAD comme chez les plantes (Cvrckova, 2000). Au voisinage du domaine DID se trouve un domaine GBD (GTPase Binding Domain) peu conservé (voir Figure 13). Ce domaine GBD permet aux formines d'interagir avec les protéines de la famille des Rho-GTPases pour réguler l'interaction DID-DAD. Enfin, entre le domaine DID et le domaine FH1 se trouvent un domaine coiled-coil qui pourrait être aussi important pour la localisation des formines (voir Figure 13).



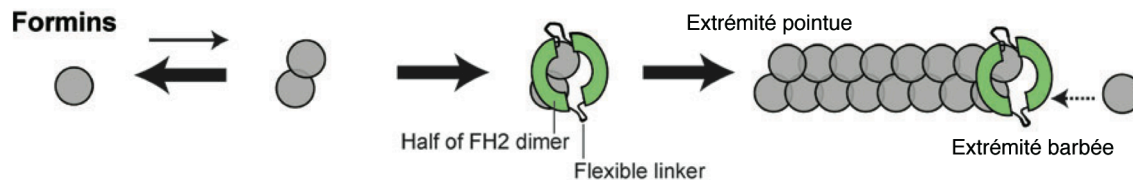
**Figure 13 : Domaines d'organisation des formines Dia.** Le domaine FH2 est responsable de l'interaction de la protéine avec l'actine et contribue à la formation de nouveaux filaments en l'absence de profiline. Le domaine FH1, riche en proline, rend la protéine active vis-à-vis de l'actine complexée à la profiline. La protéine est autoinhibée par interaction entre les domaines DID et DAD. L'interaction entre Rho GTPase et domaine GBD libère cette autoinhibition. Le domaine coiled-coil (CC) est important pour la localisation des formines. (tiré de (Goode and Eck, 2007)).

*II-3-3-2-c/ Activité biochimique des formines.*

Le domaine qui est au coeur de l'activité des formines est le domaine FH2. Seul, il stimule la polymérisation de l'actine par la nucléation de nouveaux filaments non branchés (Sagot et al., 2002b), (Pruyne et al., 2002). L'efficacité de nucléation est variable entre formines (Sagot et al., 2002b), (Pruyne et al., 2002), (Kovar et al., 2003), (Li and Higgs, 2003). Peu de choses sont connues à propos du mécanisme moléculaire de la nucléation. Contrairement au complexe Arp2/3, les formines ne présentent aucune homologie structurelle avec l'actine, ce qui rejette l'idée que les formines puissent mimer la structure d'un oligomère d'actine. Il est plus probable que les formines stabilisent un dimère (Pring et al., 2003) ou un trimère d'actine. En 2002, Pruynne et collaborateurs ont montré en microscopie électronique par un immuno-marquage à l'or colloïdal que le domaine FH2 reste lié à l'extrémité des filaments d'actine (Pruyne et al., 2002). Les formines interagissent avec les extrémités barbées des filaments avec une forte affinité, mais contrairement aux protéines de coiffe, permettent toujours l'ajout et la dissociation de sous-unités d'actine à cette même extrémité (Pring et al., 2003), (Zigmond et al., 2003), (Harris et al., 2004) (voir Figure 14). Pour caractériser cette propriété, le terme de "leaky capper" (faible protéine de coiffe) a alors été donné aux formines, par opposition au fort pouvoir bloquant des protéines de coiffe, qui inhibent totalement l'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine (Li and Higgs, 2003), (Zigmond et al., 2003). La vitesse d'élongation des filaments d'actine diminue lorsqu'ils sont coiffés par le domaine FH2 de formine. Cette diminution dépend du type de formine, et semble intrinsèque au mécanisme des formines (Kovar et al., 2006). Le cas extrême de cette inhibition est l'exemple de la formine de *la levure Schizosaccharomyces pombe* qui bloque l'élongation des filaments d'actine en absence de profiline (Kovar et al., 2003). Le "leaky capping" des formines permet de protéger l'extrémité barbée des filaments d'actine de l'action des protéines de coiffe (Zigmond et al., 2003), (Moseley et al., 2004).

Le domaine FH2 seul ne permet pas la polymérisation de l'actine complexée à la profiline (Sagot et al., 2002b), (Kovar et al., 2003), (Li and Higgs, 2003). En revanche, la présence du domaine FH1 en plus du domaine FH2 permet à la formine la nucléation et l'élongation de nouveaux filaments en présence de profiline (Sagot et al., 2002b), (Kovar et al., 2003), (Li and Higgs, 2003). Cependant, la présence du domaine FH1 ne permet pas de comprendre pourquoi l'activité de nucléation diffère entre formines. Par exemple, la région FH1FH2 de Daam1 nucléé l'actine 100 fois moins bien que mDia1 ou Bnr1 (Moseley and Goode, 2006). L'activité de nucléation des complexes actine-profiline semble aussi moins efficace que la nucléation des monomères d'actine seuls sans profiline (Li and Higgs, 2003). Par contre, la présence de profiline permet l'accélération de l'élongation des filaments d'actine. La vitesse d'élongation des filaments d'actine peut

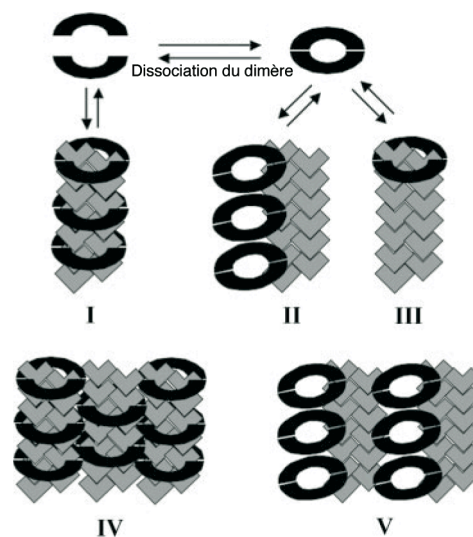
alors devenir jusqu'à 15 fois supérieure (pour la formine mDia1) à celle qu'a un filament d'actine non coiffé (Romero et al., 2004), (Kovar et al., 2006). L'accélération de l'élongation dépend des formines et de la concentration en profiline (Kovar et al., 2006). En revanche, les différences mesurées de vitesse d'élongation entre formines ne suffisent toujours pas à comprendre les différences d'activité de nucléation entre formines.



**Figure 14 : Schématisation du mécanisme de nucléation des formines.** Les formines nucléent des filaments non branchés, restent fixées à leur extrémité barbée sans empêcher leur élongation. (tiré de (Goode and Eck, 2007)).

Certaines formines ont des propriétés biochimiques supplémentaires. Bnr1, mDia2 et FRL1 interagissent avec le côté des filaments d'actine avec des affinités variables, et peuvent organiser les filaments d'actine en câbles structurés sans l'aide d'aucune autre protéine (Moseley and Goode, 2005), (Harris et al., 2006). Dans les mêmes conditions expérimentales, cette capacité à organiser les filaments d'actine en câbles n'est pas relevée pour d'autres formines telles que mDia1 ou Bnr1. L'étude concernant mDia2 et FRL1 a aussi montré que seul le domaine FH2 est nécessaire à la formation des câbles, et une comparaison précise a révélé que les domaines FH2 de formines pouvant former des câbles de filament sont chargés positivement et peuvent se dissocier et se recombinaient facilement, au contraire des domaines FH2 de formines ne pouvant former des câbles de filaments, qui sont chargés négativement et forment des dimères très stables (Harris et al., 2006). Ces données suggèrent que la liaison des formines sur le côté des filaments d'actine se fasse par dissociation du dimère comme cela est représenté sur la Figure 15-IV. Cependant le mécanisme de formation des câbles semble différer d'un point de vue mécanistique entre les deux formines FRL1 et mDia2. Alors que pour FRL1, l'activité de pontage des filaments est en compétition avec le mécanisme de processivité, pour la formine mDia2, les sites de liaison pour l'extrémité barbée du filament et pour le côté différent, suggérant alors que le lien de mDia2 pour le côté du filament ne bloque pas son activité de nucléateur processif. La formation des câbles de filaments par la formine mDia2 semble donc plutôt se faire comme cela est représenté sur le modèle de la figure 15-V (Harris et al., 2006). Plus récemment, une autre étude a montré que la formation des câbles d'actine à partir de monomère d'actine covalamment lié à la profiline (PAcov) pouvait être obtenu avec la formine mDia1 (Romero et al., 2007). Les filaments PAcov présentent une structure hélicoïdale voisine de celle des filaments d'actine, où la profiline est rejetée sur le côté du filament. Ces résultats montrent que toutes les formines

possèdent structuralement la possibilité de former des câbles de filaments suivant le modèle de la figure 15-V, pourvu que l'interaction entre la formine et le côté du filament soit suffisamment importante. FRL1 et INF2 possèdent en plus des propriétés de fragmentation des filaments d'actine (Harris et al., 2004), (Chhabra and Higgs, 2006). La formine INF2, dont les domaines FH1 et FH2 sont inversés, possède ajouté à cela des propriétés particulières d'accélération de la dépolymérisation des filaments d'actine (Chhabra and Higgs, 2006). Tout cela montre la complexité fonctionnelle de cette famille de protéine.



**Figure 15 : Modèles d'interaction des formines pour le côté des filaments et formation des câbles.** Dans le modèle de dissociation du dimère (à gauche sur le schéma, cas de FRL1), la formine lie le côté et l'extrémité barbée des filaments de façon similaire (schéma I). La formation des câbles de filaments se fait par l'intermédiaire de résidus positionnés sur l'extérieur de l'anneau formé par le dimère de formine (schéma IV). Dans le modèle de non-dissociation du dimère (à droite sur le schéma, cas de mDia2), la formine lie l'extrémité barbée (schéma III) et le côté des filaments (schéma II) de façon différente. La formation des câbles se fait aussi par l'intermédiaire de résidus positionnés sur l'extérieur de l'anneau formé par le dimère de formine (schéma V), mais l'intérieur de l'anneau restant libre, la formine peut éventuellement rester processive sur le côté du filament. (tiré de (Harris et al., 2006)).

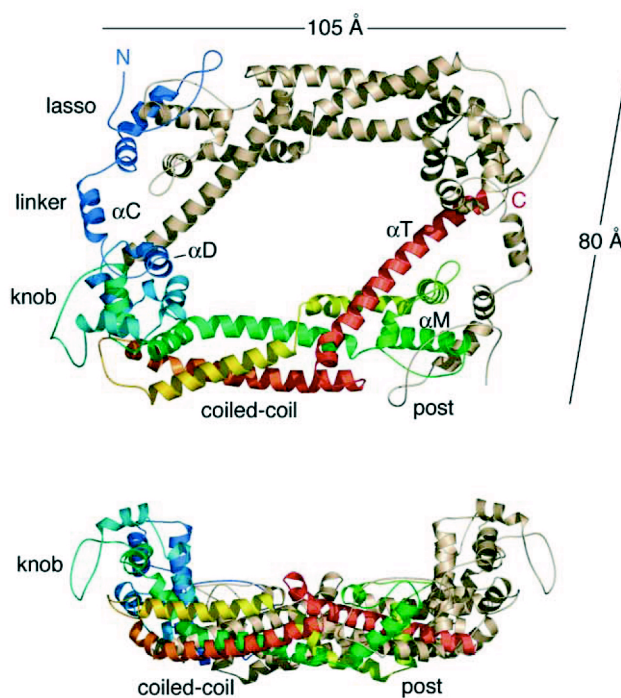
#### *II-3-4-2-d/ Structure cristallographique des formines.*

Les structures de formine connues à ce jour concernent le plus souvent le domaine FH2 seul, et éventuellement la région linker entre les domaines FH1 et FH2. Le domaine FH1 étant un domaine riche en proline, il est probable qu'il ne soit pas ou peu structuré, et qu'il soit par conséquent difficile à cristalliser avec le domaine FH2.

La structure cristallographique de domaines FH2 de mDia1 et mDia3 a montré que ceux-ci possèdent une forme de croissant avec trois domaines distincts riches en hélices  $\alpha$  (Shimada et al., 2004). Cependant, les constructions du domaine FH2 utilisées pour cette étude sont monomériques et n'interagissent avec les extrémités barbées de



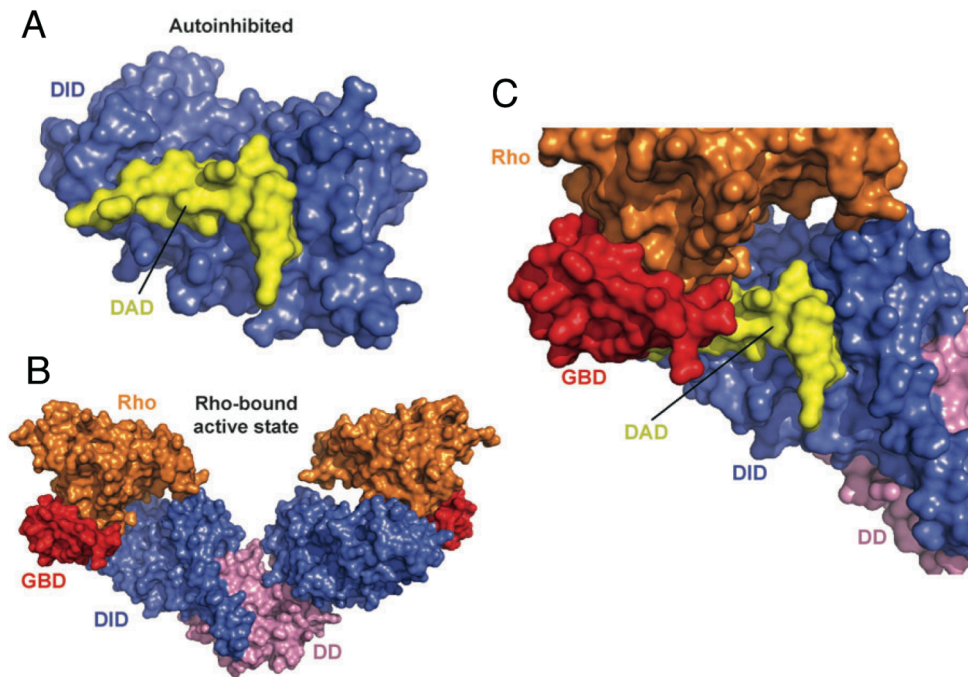
filaments d'actine que pour les coiffer à la manière des protéines de coiffe, c'est-à-dire en inhibant toute polymérisation aux extrémités barbées (Shimada et al., 2004). Donc ces données sont largement insuffisantes pour la compréhension du mécanisme particulier des formines. Simultanément, une seconde structure a été obtenue d'un domaine FH2 actif de Bni1. Cette structure montra que la région N-terminale située à une extrémité du croissant et appelée région "lasso" (en bleu sur la Figure 16) pouvait interagir avec la région C-terminale située à l'autre bout du croissant et appelée région "post" (en vert sur la Figure 16 et Xu et al., 2004). L'ensemble de la structure dimérique prend alors la forme d'un tore symétrique. Vu de côté, ce tore apparaît courbé. Une dimérisation stable des formines fut parallèlement prouvée par des études biochimiques (Harris et al., 2004). Cette dimérisation semble fondamentale à l'activité des formines. Toute mutation d'acide aminé qui perturbe la dimérisation dégrade simultanément les propriétés nucléatrices de la formine (Xu et al., 2004). Chaque domaine FH2 possède aussi une région peu ordonnée de l'anneau appelée région "linker" (en bleu sur la Figure 16, voisine de la région lasso), qui confère une flexibilité à la structure.



**Figure 16 : Structure atomique du dimère de formine Bni1p obtenu à partir du spectre de diffraction aux rayons X de la protéine.** Le schéma du haut montre comment la région lasso vient interagir avec la région post pour former un dimère de formine en forme d'anneau. La région linker confère à cet anneau une certaine flexibilité. Le schéma du bas représente une vue de côté, où le dimère apparaît courbé. (tiré de (Xu et al., 2004)).

La structure du dimère FH2 a permis à Xu et collaborateurs de prédire les sites probables de liaison à l'actine (Xu et al., 2004). Cette prédiction fut par la suite corroborée par une nouvelle structure du domaine FH2 de Bni1 complexé avec le tetramethylrhodamine-actine (Otomo et al., 2005b). Chaque sous-unité de FH2 interagit avec les monomères d'actine sur le bord courbé de l'anneau. L'orientation des monomères d'actine dans cette structure suggère une orientation du futur filament orthogonalement à l'anneau, avec une extrémité barbée du filament qui reste en contact avec la formine, un résultat compatible avec les travaux de Pruyne et collaborateurs (Pruyne et al., 2002). Cette structure obtenue pourrait correspondre à la structure d'un noyau dimérique d'actine stabilisé par formine.

Plusieurs équipes ont aussi étudié d'un point de vue structural les domaines responsables de l'autoinhibition des formines. Différentes constructions de la région N-terminale des formines ont été cristallisées, soit seules (Otomo et al., 2005a), soit complexées à RhoC (Rose et al., 2005), soit complexées au domaine DAD (voir Figure 17) (Lammers et al., 2005), (Nezami et al., 2006). Toutes les régions N-terminales cristallisées comprennent au minimum le domaine DID responsable de l'autoinhibition. La comparaison de ces structures, associée à des études biochimiques basées sur des mutations systématiques des acides aminés principalement impliqués dans les différentes interactions, a permis de comprendre comment l'autoinhibition est réalisée, puis levée par compétition entre les Rho GTPases et le domaine DAD. Rho interagit principalement avec le domaine GBD, alors que le domaine DAD interagit seulement avec le domaine DID, pourtant la comparaison des différents complexes a montré que DAD et les RhoGTPases ne pouvaient pas simultanément se fixer sur la région N-terminale pour des raisons principalement stériques (voir Figure 17) et électrostatiques (Nezami et al., 2006). Des études quantitatives ont par ailleurs montré que RhoA levait l'autoinhibition des formines grâce à une interaction dix fois plus forte que le domaine DAD pour la région N-terminale des formines (Nezami et al., 2006).



**Figure 17 : Mécanisme d'activation par Rho.**

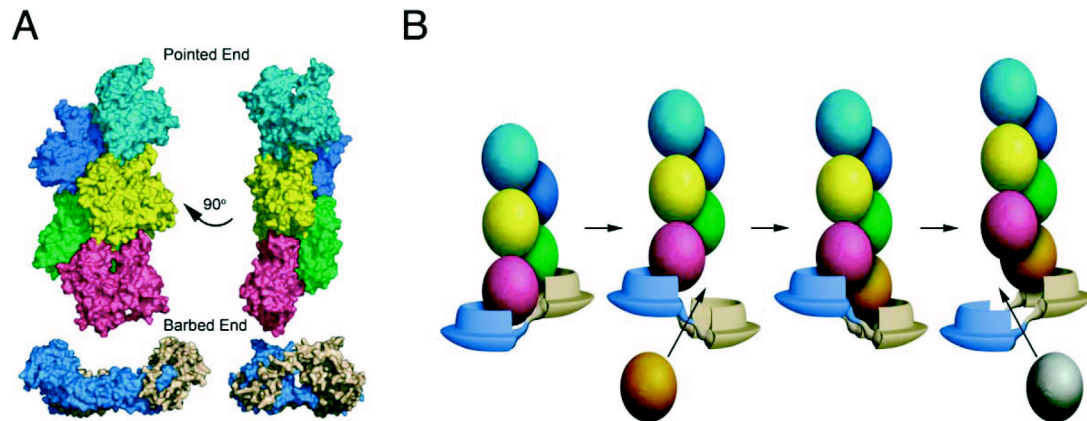
(A) Structure du domaine DAD en interaction avec le domaine DID.

(B) Structure de Rho en interaction avec les domaines DID et GBD, cristallisé comme un dimère symétrique.

(C) La superposition hypothétique des deux structures (A) et (B) a montré que la présence de Rho déplace le domaine GBD à la surface du domaine DID. Le domaine GBD bloque alors la région d'interaction du domaine DID avec le domaine DAD et lève l'autoinhibition. (tiré de (Goode and Eck, 2007)).

#### *II-3-4-2-e/ Le mécanisme processif.*

La structure en forme d'anneau flexible a permis à Xu et collaborateurs de proposer un mécanisme moléculaire nouveau pour relier les propriétés biochimiques particulières des formines à leur structure (Xu et al., 2004). Le dimère de formine est capable de se fixer à l'extrémité barbée des filaments d'actine, et sa flexibilité lui permet de se déplacer en marchant à l'extrémité des filaments d'actine, en permettant progressivement l'insertion de monomères. Ce mécanisme nouveau a été appelé mécanisme processif des formines (voir Figure 18).



**Figure 18 : Mécanisme de la processivité des formines. (tiré de (Xu et al., 2004)).**

(A) Position prédite du dimère de formine face à l'extrémité barbée des filaments d'actine.

(B) Schématisation du mécanisme processif des formines, qui se fait par des changements de conformation successifs du dimère à l'extrémité barbée des filaments d'actine. Le détachement d'une moitié du dimère du filament d'actine permet l'insertion d'une nouvelle sous-unité d'actine et l'élongation du filament.

Le modèle de la processivité a été complexifié progressivement pour expliquer le comportement des formines. Récemment, Shemesh et Kozlov (Shemesh and Kozlov, 2007) ont montré qu'une variation de la flexibilité de la région linker pouvait expliquer les variations dans les vitesses d'élongation entre les différentes formines. Deux autres études suggèrent que les formines accélèrent l'hydrolyse du nucléotide sur l'antépénultième sous-unité d'actine du filament, et accélèrent ainsi la dissociation de la profiline de cette sous-unité, utilisant ainsi à la façon d'un moteur l'énergie libre libérée par l'hydrolyse du nucléotide des sous-unités d'actine pour permettre le mécanisme de processivité (Romero et al., 2004), (Romero et al., 2007). En revanche, ces résultats sont en contradiction avec d'autres résultats montrant que le mécanisme processif permet aussi l'insertion de sous-unités d'actine-ADP (Kovar, 2006), et que la dissociation de la profiline n'est pas couplée à l'hydrolyse du nucléotide et à la dissociation du phosphate.

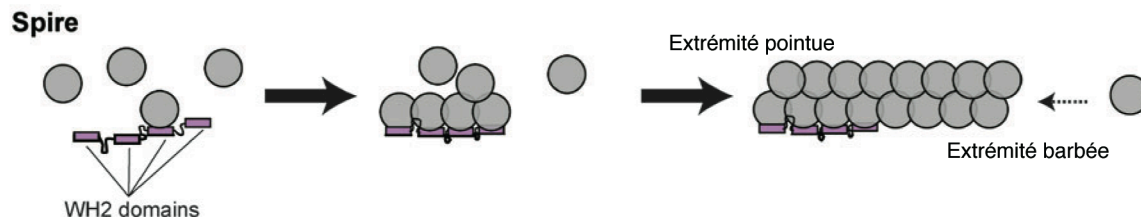
Nous avons vu préalablement que la réaction de polymérisation à l'extrémité barbée des filaments d'actine était limitée par la diffusion des monomères d'actine en solution (Drenckhahn and Pollard, 1986). Cependant Romero et collaborateur ont découvert que la présence simultanée de la formine mDia1 et de la profiline accélérât la vitesse d'élongation des filaments d'actine à l'extrémité barbée. Comment la présence simultanée de formine et de profiline permet-elle cette accélération? Le domaine FH1, riche en profiline, est un domaine prédit comme non structuré, et qui se présente probablement en solution comme un long bras diffusant librement à proximité du domaine FH2. En interagissant directement avec l'actine complexée à la profiline par

l'intermédiaire des longues séquences de profiline, il pourrait permettre une augmentation locale de la concentration d'actine monomérique à proximité des extrémités barbées (Vavylonis et al., 2006), (Pollard, 2007). En revanche, le mécanisme de transfert des sous-unités d'actine du domaine FH1 vers l'extrémité barbée des filaments d'actine reste incompris.

Enfin, pour chaque nouvelle sous-unité insérée au cours de la polymérisation, la symétrie hélicoïdale du filament d'actine impose une rotation de la formine à l'extrémité barbée du filament. Ainsi, pour un filament s'allongeant à la vitesse de 50 sous-unités par seconde, la formine devrait aussi tourner de 2 tours par seconde. Or, aucune observation microscopique n'a pu relever une telle rotation (Romero et al., 2004), (Kovar and Pollard, 2004). Plusieurs modèles ont tenté de résoudre ce paradoxe. Tout d'abord, il est possible de penser que la dissociation et la réassociation de la formine à l'extrémité barbée du filament d'actine soient suffisamment rapides pour expliquer la non-rotation apparente du filament. Comme cela paraît peu probable au vu de la persistance du lien entre la formine et le filament, Shemesh et collaborateurs ont suggéré un autre modèle mécanique se basant sur la structure du domaine FH2 (Shemesh et al., 2005). Dans ce modèle, le mécanisme de la processivité inclut une étape supplémentaire appelée "screw mode" au cours de laquelle la formine peut relâcher la contrainte de torsion induite par la polymérisation du filament. La processivité de la formine à l'extrémité barbée des filaments d'actine reste néanmoins un paradoxe qui nécessitera beaucoup d'efforts dans l'avenir pour être levé.

### ***II-3-4-3/ Spire.***

Le dernier nucléateur découvert à ce jour est Spire, qui a été identifié la première fois chez la drosophile (Quinlan et al., 2005). L'activité de nucléation de Spire est comparable à celle des formines, mais reste largement inférieure à celle du complexe Arp2/3. Spire contient 4 domaines WH2 successifs qui sont supposés, par leur interaction avec l'actine monomérique, regrouper les monomères pour faciliter la formation d'un noyau stable d'actine. Suite à la nucléation d'un nouveau filament, Spire reste fixé à l'extrémité pointue des filaments d'actine, et stimule donc la formation de filaments d'actine non branchés, et dont l'extrémité barbée peut s'allonger librement (voir Figure 19).



**Figure 19 : Schématisation du mécanisme de nucléation de Spire.** Les 4 domaines WH2 successifs de Spire regroupent 4 sous-unités d'actine qui initient la formation d'un nouveau filament dont l'extrémité barbée peut s'allonger librement. (tiré de (Goode and Eck, 2007)).

### II-3-4/ Les facteurs de dépolymérisation.

#### II-3-4-1/ La dépolymérisation des filaments se fait par l'ADF/cofiline.

Afin d'assurer l'existence d'un réservoir d'actine monomérique disponible à la polymérisation, les cellules eucaryotes doivent non seulement contrôler la quantité d'extrémités barbées libres de filaments d'actine, mais aussi s'assurer en permanence de la reconstitution rapide du stock d'actine monomérique (Pollard and Borisy, 2003). Ce renouvellement permanent du réservoir se fait principalement par le désassemblage de filaments âgés.

Les protéines de la famille des ADF/cofiline sont les principaux facteurs responsables de l'accélération du turnover par le désassemblage des filaments d'actine (Lappalainen and Drubin, 1997). Ces petites protéines (15 à 22 kDa) sont présentes chez tous les eucaryotes, sont hautement conservées entre espèces et ont été montrées comme essentielles dans de nombreux organismes (Ono, 2007). Étonnemment, bien que l'ADF n'ait aucune similarité de séquence avec la gelsoline, sa structure est très proche de celle des domaines gelsolines (Hatanaka et al., 1996).

#### II-3-4-2/ Mécanisme biochimique de l'ADF/cofiline.

L'ADF/cofiline peut lier l'actine sous sa forme monomérique ou filamenteuse à un ratio 1:1 (Maciver et al., 1991b), (Carlier et al., 1997). Nous avons vu précédemment qu'en absence de protéines régulatrices, le désassemblage des filaments d'actine se faisait principalement par dépolymérisation de l'extrémité pointue des filaments, où la proportion de sous-unités d'actine-ADP qui caractérise l'âge des filaments d'actine est la plus importante. L'ADF/cofiline se lie beaucoup plus fortement sur les filaments d'actine-ADP que sur les filaments d'actine-ATP, induisant par conséquent préférentiellement un désassemblage des filaments d'actine-ADP (voir Table 2) (Carlier et al., 1997); (Blanchoin and Pollard, 1999). L'ADF/cofiline accélère dix fois la dissociation du phosphate des sous-unités d'actine-ADP-Pi ( $k_- = 0.03 \text{ s}^{-1}$  en présence d'ADF/cofiline)

(Blanchoin and Pollard, 1999). De même, l'ADF/cofiline interagit plus fortement avec l'actine monomérique sous sa forme ADP que ATP, et inhibe l'échange du nucléotide (Nishida, 1985), (Blanchoin and Pollard, 1998). Après dépolymérisation, l'échange rapide du nucléotide ADP en ATP se fait par dissociation de l'ADF/cofiline au profit de la profiline (Didry et al., 1998), (Blanchoin and Pollard, 1998). L'activité de l'ADF/cofiline est négativement régulée par la phosphorylation de la Ser-3 (Ser-6 chez les plantes), et est dépendante du pH ; l'activité de désassemblage des filaments d'actine reste faible pour des pH < 7, et devient très forte pour des pH supérieurs (Ono, 2007).

Le mécanisme utilisé par les protéines de la famille des ADF/cofiline pour désassembler les filaments d'actine-ADP n'est toujours pas précisément connu, mais les données les plus récentes suggèrent que ces protéines utilisent un processus basé sur la fragmentation des filaments d'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006), (Pavlov et al., 2007). Chaque coupe de filament d'actine par l'ADF/cofiline permet la création d'une nouvelle extrémité pointue, et double ainsi l'efficacité de désassemblage d'un filament d'actine (voir Table 2). Il va de soi que ce processus engendre simultanément la création d'une nouvelle extrémité barbée qui doit être immédiatement bloquée par une protéine de coiffe pour empêcher la repolymérisation. Une étude montre que l'ADF/cofiline accélère la dissociation des sous-unités d'actine aux extrémités pointues jusqu'à 25 fois, mais elle ne tient pas compte de la fragmentation (Carlier et al., 1997), et semble en contradiction avec des résultats plus récents obtenus directement par observation sur filament unique (Andrianantoandro and Pollard, 2006), (Pavlov et al., 2007).

$\text{GATP} + \text{ADF} \xrightleftharpoons{1} \text{GATP-ADF}$	$K_{d,1}$	$0.66 \mu\text{M}$
$\text{GADP} + \text{ADF} \xrightleftharpoons{2} \text{GADP-ADF}$	$K_{d,2}$	$0.19 \mu\text{M}$
$\text{FATP} + \text{ADF} \xrightleftharpoons{3} \text{FATP-ADF}$	$K_{d,3}$	$5.9 \mu\text{M}$
$\text{FADP} + \text{ADF} \xrightleftharpoons{4} \text{FADP-ADF}$	$k_{+,4}$	$0.0085 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
	$k_{+,4}$	$0.075 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (avec fixation coopérative)
	$k_{-,4}$	$0.005 \text{s}^{-1}$
$\text{FADP-ADF} \xrightleftharpoons{5} 2\text{FADP-ADF}$	$k_{+,5}$	$0.012 \text{s}^{-1}$

**Table 2 : Constantes cinétiques d'interaction de l'ADF/cofiline avec l'actine monomérique (réactions 1 et 2) et filamenteuse (réactions 3 et 4) et constante cinétique de fragmentation des filaments d'actine (réaction 5).** (tiré de (Blanchoin and Pollard, 1998) et (Blanchoin and Pollard, 1999)).

L'activité de l'ADF/cofiline est fortement dépendante de sa concentration. L'efficacité de fragmentation est optimale à faible concentration (quelques dizaines de nM, soit << Kd) (Andrianantoandro and Pollard, 2006), (Pavlov et al., 2007). De plus, la



fragmentation par ADF/cofiline est bien moins importante pour des filaments courts (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ) que pour des filaments longs (de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{m}$ ) (Andrianantoandro and Pollard, 2006). En présence d'ADF/cofiline, les longs filaments d'actine ont donc tendance à se segmenter en fragments plus courts. La manière dont ces fragments dépolymérisent rapidement reste à l'heure actuelle inconnue, mais pourrait faire intervenir d'autres facteurs cellulaires. A forte concentration, l'ADF/cofiline semble avoir un effet contraire de nucléation de l'actine monomérique et de stabilisation des filaments formés (Carlier et al., 1997), (Andrianantoandro and Pollard, 2006). L'effet nucléateur de l'ADF/cofiline à haute concentration n'est à l'heure actuelle pas démontré *in vivo*. Andrianantoandro et Pollard suggèrent l'existence d'un gradient d'ADF/cofiline dans le lamellipode, avec des fortes concentrations vers le bord cellulaire induisant la polymérisation de l'actine et des faibles concentrations à l'arrière induisant le désassemblage du polymère (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Cependant, cette hypothèse ne semble pas rejoindre les observations faites *in vivo* sur la localisation de l'ADF/cofiline à l'arrière du lamellipode, là où le réseau branché se désassemble (Svitkina and Borisy, 1999a).

### ***II-3-4-3/ Mécanisme d'action de l'ADF/cofiline.***

McGough et collaborateurs ont montré en 2005 que la saturation des filaments d'actine par l'ADF/cofiline modifiait le "twist" du filament d'actine de 5 degrés par sous-unités (McGough et al., 1997). Dans cette conformation, les filaments d'actine présentent une stabilité équivalente aux filaments non décorés par l'ADF/cofiline (Prochniewicz et al., 2005). Il existe donc deux états énergétiquement favorables dans lesquels peuvent se trouver les filaments d'actine (Prochniewicz et al., 2005): un état dit "C" qui correspond à l'état du filament décoré par la cofiline et un état dit "N" qui correspond à l'état du filament non décoré par la cofiline. Quelques molécules d'ADF/cofiline sont suffisantes pour modifier le twist du filament sur une longueur équivalente à quelques centaines de sous-unités (Galkin et al., 2001), (Prochniewicz et al., 2005). En présence d'ADF/cofiline, les filaments courts ( $< 1 \mu\text{m}$ ) peuvent donc entièrement passer de l'état "N" à l'état "C" en restant stables. En revanche, les filaments plus longs en présence de faibles concentrations d'ADF/cofiline présentent à la fois des portions dans l'état "N" et des portions dans l'état "C" (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Une première conséquence est que la fixation de l'ADF/cofiline devient coopérative (Ressad et al., 1999), (De La Cruz, 2005), car les nouvelles molécules d'ADF/cofiline se fixant sur le filament ont tendance à se lier là où le filament est déjà "C", c'est-à-dire là où l'ADF/cofiline est déjà fixée. Il se forme donc progressivement des séquences de quelques dizaines d'ADF/cofiline sur le filament d'actine. Une deuxième conséquence est



qu'il existe dans le filament une interface entre les zones dans l'état "C" et les zones dans l'état "N" qui est probablement instable et provoque la fragmentation des filaments d'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006).

### **II-3-5/ Les protéines de stabilisation des filaments.**

Afin de maintenir l'intégrité de certaines structures de filaments d'actine vis-à-vis de la fragmentation et/ou de la dépolymérisation, les cellules peuvent choisir de stabiliser les filaments d'actine par l'intermédiaire de protéines spécifiques liant le côté des filaments d'actine. Une protéine particulièrement impliquée est la tropomyosine, qui lie le côté des filaments d'actine, empêche la coupe des filaments, et réduit leur vitesse de dépolymérisation à l'extrémité pointue. Un effet supplémentaire de la tropomyosine est d'empêcher la formation de branches par le complexe Arp2/3 (Blanchoin et al., 2001).

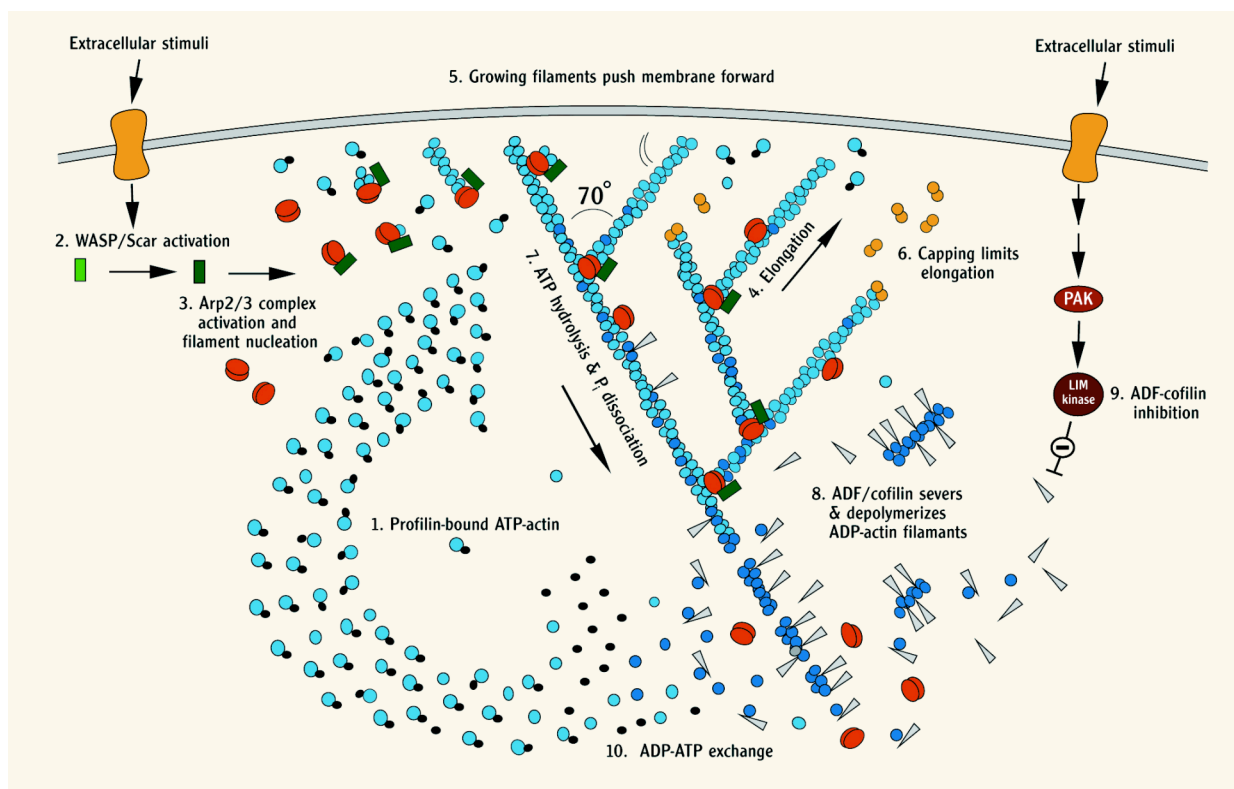
### **II-3-6/ Les protéines de réticulation.**

Les protéines de réticulation interagissent avec le côté des filaments d'actine pour structurer ces filaments en réseaux. Pour créer cette organisation, la cellule dispose de toute une batterie de protéines qui lient les filaments entre eux avec une géométrie et une élasticité particulières. L'élaboration de réseaux par les différents types de protéines de réticulation permet aux cellules d'adapter la réponse mécanique du cytosquelette à ses besoins (Tseng et al., 2005).

### ***II-4/ Le modèle de nucléation dendritique.***

La connaissance plus précise des protéines associées à la motilité cellulaire et l'assurance que ce jeu de protéines est nécessaire et suffisant à une motilité efficace (voir partie suivante, (Loisel et al., 1999)) couplé à de nombreuses données biochimiques sur l'activité de ces protéines a permis d'établir en 2000 un modèle simplifié de la dynamique de formation et de désassemblage des réseaux branchés de filaments d'actine (Pollard et al., 2000). Ce modèle, appelé modèle de nucléation dendritique, permet de proposer un rôle pour chaque protéine dans un cycle où l'actine est successivement polymérisée pour former les réseaux branchés, puis dépolymérisée et recyclée pour reformer le réservoir d'actine monomérique (voir Figure 20). En l'absence d'extrémités barbées, l'actine complexée à la profiline forme un réservoir de monomères pour la cellule (étape 1). L'activation à la membrane des protéines de la famille WASp (étape 2) active le complexe Arp2/3 (étape 3) qui crée de nouvelles extrémités barbées

depuis le côté de filaments préexistants, à proximité de la membrane. L'élongation rapide de ces extrémités (étape 4) permet au cytosquelette de pousser la membrane vers l'avant (étape 5). Rapidement, les filaments d'actine sont coiffés par des protéines de coiffe qui bloquent leur élongation (étape 6). L'action combinée des protéines de coiffe et du complexe Arp2/3 permet de former des réseaux branchés denses de filaments d'actine. L'hydrolyse progressive du nucléotide ATP des filaments d'actine suivi de la dissociation du phosphate (étape 7) permet la fixation sur les filaments de l'ADF/cofiline qui désassemble le réseau par fragmentations successives puis dépolymérisation des petits filaments-ADP (étape 8). Enfin les monomères d'actine-ADP perdent l'ADF/cofiline à laquelle ils sont liés au profit d'une complexation avec la profiline qui accélère l'échange du nucléotide ADP pour un nucléotide ATP (étape 10). Cela permet le recyclage du monomère d'actine, qui devient prêt à repolymériser à une nouvelle extrémité barbée.



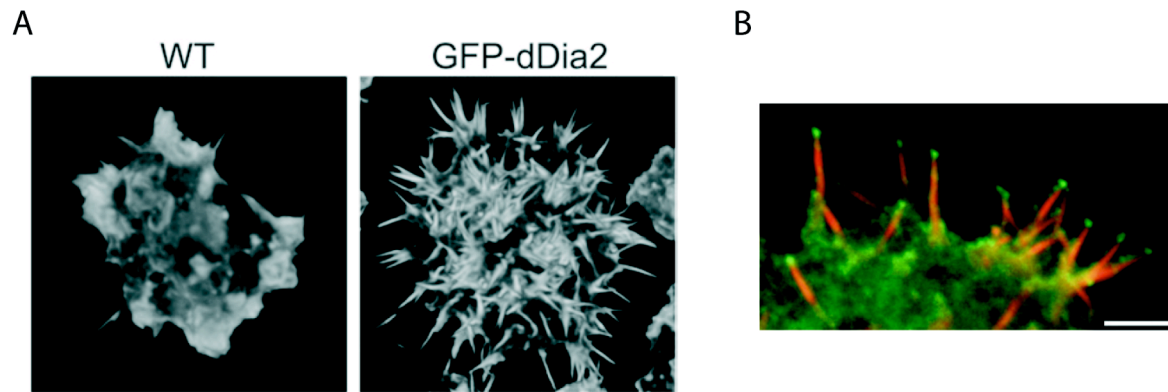
**Figure 20 : Modèle de nucléation dendritique de l'actine à la membrane.** Les étapes du cycle sont détaillées dans le texte. (tiré de (Pollard et al., 2000)).

### ***II-5/ Le modèle de formation des câbles.***

Le modèle précédent, s'il permet d'expliquer la dynamique des réseaux branchés de filaments d'actine, en particulier dans le lamellipode, ne permet en revanche pas de comprendre la dynamique des câbles d'actine. La plupart des études faites à ce sujet concernent la formation de câbles d'actine dans les levures (Yang and Pon, 2002), (Sagot

et al., 2002a) ou dans les protrusions du type filopode (Faix and Rottner, 2006). Les filopodes sont initiés par des câbles d'actine rigides qui émergent des réseaux branchés par Arp2/3 (Mejillano et al., 2004), (Vignjevic et al., 2003), (Svitkina et al., 2003), (Haviv et al., 2006) ou directement initiés par les formines (Schirenbeck et al., 2005b), (Schirenbeck et al., 2005a).

La formation de filopodes semble être régulée par plusieurs protéines différentes au bord du lamellipode. Tout d'abord, la formation de filopodes est favorisée par la déplétion des protéines de coiffe à la surface du lamellipode ou par la surexpression de protéines inactivant les protéines de coiffe (Mejillano et al., 2004). Dans ce cas-là, il semble que la réduction de la concentration en protéines de coiffe implique la formation de réseaux de filaments branchés moins denses, avec des filaments plus longs. Par la suite, les filaments plus longs se regroupent en câbles capables de déformer la membrane et d'initier la formation de filopodes. Plus récemment, d'autres études ont montré que la déplétion de protéines de réticulation, telles que la fascine, réduisait le nombre de filopodes *in vivo* (Vignjevic et al., 2006). Ces études suggèrent donc que les câbles doivent être stabilisés pour former les filopodes. *In vitro*, deux études ont montré qu'il était possible de contrôler l'assemblage de l'actine en câbles ou en réseaux branchés en faisant varier le rapport entre la concentration en fascine et la concentration en protéines de coiffe ou en complexe Arp2/3 (Vignjevic et al., 2003), (Haviv et al., 2006). Cependant, chez *Dictyostelium discoideum* les formines, sont fortement exprimées à l'extrémité des filopodes (Schirenbeck et al., 2005b) (voir Figure 21). Celles-ci semblent donc jouer un rôle majeur pour la formation de ces structures, éventuellement par leurs propriétés particulières de protection des extrémités barbées des filaments d'actine envers les protéines de coiffe, ou aussi par leur capacité d'organiser les filaments d'actine en câbles.



**Figure 21 : Rôle de la formine dDia2 pour la formation des filopodes chez *Dictyostelium discoideum*.**

(A) La surexpression de dDia2 chez *Dictyostelium* induit la formation de nombreux filopodes supplémentaires. (tiré de (Schirenbeck et al., 2005a)).

(B) La formine dDia2 (repérée ici en vert par un marquage avec anticorps GFP) est fortement localisée à l'extrémité des filopodes riches en actine (l'actine est marquée à la rhodamine phalloïdine et apparaît en rouge). Echelle : 2  $\mu\text{m}$ . (tiré de (Schirenbeck et al., 2005a)).

Enfin, Diez et collaborateurs ont utilisé en 2005 la technique de microscopie à onde évanescente pour observer chez *Dictyostelium discoideum* le cytosquelette d'actine cortical (Diez et al., 2005). Cette étude a permis de montrer que la plupart des nouveaux filaments d'actine sont formés et polymérisent le long de filaments préexistants. Ces données suggèrent que ce phénomène pourrait jouer un rôle majeur pour la formation des câbles d'actine dans la cellule. Dans cette même étude, les auteurs ont été capables d'observer que les câbles formés étaient suffisamment puissants pour déformer la membrane cellulaire, et émettre ainsi des protrusions de type filopode.

### **III L'étude *in vitro* des protéines du cytosquelette par l'imagerie.**

#### ***III-1/ Notion de système biomimétique.***

Parce que l'étude *in vivo* du cytosquelette ne permet pas la plupart du temps d'avoir facilement accès aux mécanismes moléculaires des protéines associées à l'actine, des études *in vitro* ont été menées à partir de protéines purifiées. Différents types d'expériences peuvent alors être conduits pour remonter aux propriétés individuelles ou collectives des protéines. Dans la plupart de ces expériences, comme c'est le cas dans les essais effectués en fluorimétrie avec de l'actine marquée au pyrène, il est possible de caractériser directement les interactions entre protéines, et de mesurer l'influence d'une protéine sur le comportement d'autres protéines.

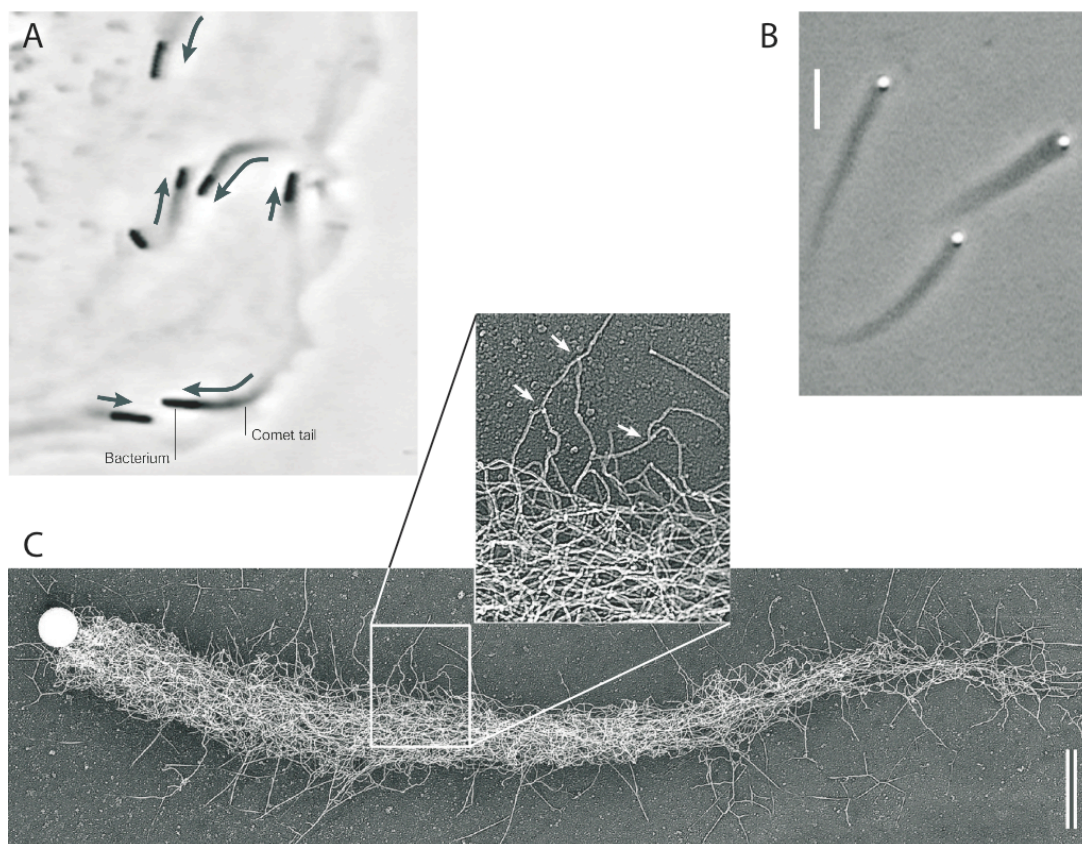
Cependant, la caractérisation des interactions directes entre protéines ne suffit souvent pas à comprendre le rôle particulier d'une protéine au sein d'un processus biologique complexe, ou de nombreux effets collectifs rentrent en jeu. L'idéal est alors de pouvoir reconstruire *in vitro* un système biomimétique mimant au mieux le phénomène biologique complexe étudié. La reconstitution donne alors l'assurance de la compréhension précise du processus biologique, de la connaissance de l'ensemble minimal de protéines responsables du processus, et enfin permet plus facilement d'identifier le rôle précis qu'a chacune des protéines dans le processus biologique.

#### ***III-2/ L'essai de motilité.***

A ce jour, le système biomimétique le plus performant permettant de comprendre les phénomènes motiles et la dynamique de l'actine qui en résulte est l'essai conçu par Loisel et collaborateurs (Loisel et al., 1999).

Pour réaliser cet essai, les auteurs se sont inspirés de la capacité qu'ont certains organismes pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri* à parasiter des cellules vivantes (Theriot, 1995) (voir Figure 22A). De tels organismes peuvent détourner le cytosquelette cellulaire d'actine de la cellule hôte pour se déplacer (Tilney and Portnoy, 1989), (Dabiri et al., 1990). Pour cela, ils possèdent à la surface extérieure de leur membrane soit une protéine capable d'activer le complexe Arp 2/3 (ActA pour *Listeria*), soit une protéine capable de recruter N-WASP (IcsA pour *Shigella*). Cela permet par la suite aux parasites, à partir de l'actine monomérique de la cellule infectée, de

polymériser autour d'eux une comète d'actine capable de les propulser au sein du cytoplasme de la cellule hôte (voir Figure 22). Loisel et collaborateurs ont cherché avec succès quel pouvait être l'ensemble minimal de protéines pouvant permettre à de tels organismes de créer et d'organiser cette comète d'actine (voir Figure 22B). Ces protéines actrices sont l'actine, le complexe Arp 2/3 activé, les protéines de coiffe et l'ADF/cofiline. D'autres protéines, comme la profiline, améliorent l'efficacité du mouvement, mais ne sont pas strictement nécessaires. Par la suite, les activateurs ActA ou N-WASp du complexe Arp2/3 ont pu être greffés avec succès sur des billes de polystyrène pour mettre leur mouvement (Pantaloni et al., 2001), (Bernheim-Groswasser et al., 2002).



**Figure 22 : De la motilité intra-cellulaire d'organismes pathogènes à la reconstitution à partir de protéines purifiées.**

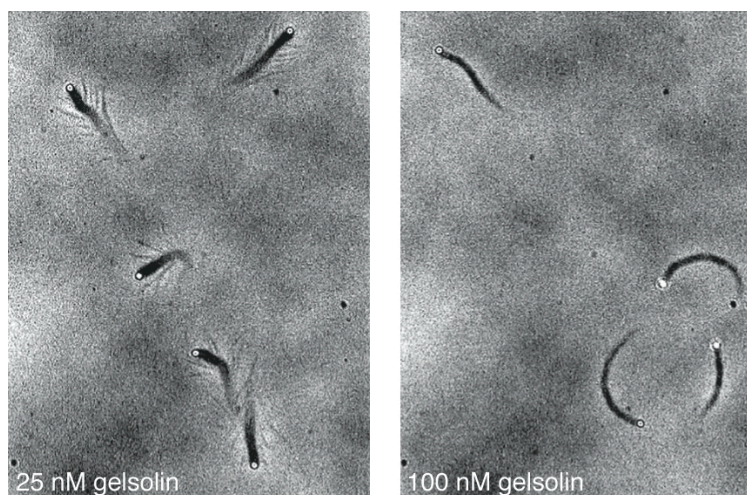
(A) Mouvement de *Listeria Monocytogenes* dans une cellule épithéliale infectée, observée en microscopie à contraste de phase. On distingue en particulier la comète d'actine qui pousse la bactérie. La direction du mouvement des bactéries est indiquée par une flèche bleue (tiré de (Cameron et al., 2000)).

(B) Essai biomimétique du mouvement d'organismes pathogènes, réalisé uniquement à partir de protéines purifiées. Des billes de polystyrène activées avec un activateur du complexe Arp2/3 sont placées dans un milieu de motilité comprenant de l'actine, de la profiline, du complexe Arp2/3, des protéines de coiffe et de l'ADF/cofiline. L'observation en contraste de phase permet d'observer le mouvement de la bille, mais ne permet pas de visualiser la dynamique du réseau branché à l'échelle du filament individuel (tiré de (Pantaloni et al., 2001)).

(C) Observation de la comète d'actine en microscopie électronique. Ce type de microscopie permet de visualiser l'actine à l'échelle du filament individuel, mais ne permet pas de comprendre leur dynamique. (tiré de (Cameron et al., 2001)).



Ce système biomimétique est un moyen très puissant pour comprendre les phénomènes motiles. Il a permis non seulement de s'assurer que toutes les protéines fondamentales pour la motilité étaient connues, mais il a permis de mesurer directement l'efficacité des processus motiles (Bernheim-Groswasser et al., 2002). Ainsi, on peut maintenant mesurer à quelles concentrations les protéines rendent le mouvement le plus efficace, ainsi que l'effet de variations de concentration sur le mouvement (voir Figure 23). On peut également remplacer ces protéines par d'autres pour vérifier si elles ont des activités complémentaires, ou en ajouter pour voir si éventuellement elles influent sur l'efficacité des phénomènes motiles.



**Figure 23 : Influence de la concentration en gelsoline dans l'essai reconstitué de motilité.** A 25 nM en gelsoline, la vitesse des billes est plus faible et le mouvement moins efficace. La faible concentration en protéines de coiffe permet aux extrémités barbées des filaments formés par le complexe Arp2/3 de continuer à s'allonger et à sortir de la comète d'actine, donnant aux comètes cette allure en arête de poisson. (Wiesner et al., 2003).

La plupart des essais réalisés jusqu'à présent ont été effectués avec le complexe Arp2/3 dans le rôle de nucléateur de l'actine. Comme nous l'avons vu, il permet dans les processus motiles de polymériser un réseau dense de filaments ayant leur extrémité barbée au contact de la cible et pouvant donc exercer sur celle-ci la force nécessaire au mouvement. Ce type d'essai permet donc de propulser les billes grâce à la formation d'un réseau branché de filaments d'actine, et constitue donc l'essai biomimétique modèle pour comprendre les propriétés de tels réseaux ainsi que le fonctionnement du lamellipode (Cameron et al., 2000). Plus récemment, nous avons vu que les protéines de la famille des formines sont aussi des nucléateurs de l'actine, qui se maintiennent à l'extrémité barbée des filaments d'actine tout en permettant leur élongation de façon processive (Pruyne et al., 2002). Ces protéines sont aussi responsables *in vivo* de la formation des câbles d'actine. Pour ces raisons, Romero et collaborateurs ont greffé directement sur des billes de polystyrène la formine mDia1, puis ont placé ces billes dans

un milieu de motilité (Romero et al., 2004). Le changement de facteur de nucléation permet aussi le mouvement des billes, qui sont alors propulsées par des câbles de filaments. Cet essai constitue donc un essai biomimétique modèle pour comprendre la dynamique des câbles d'actine tels que ceux qui sont trouvés dans les filopodes.

Si cet essai a permis de faire un bond en avant dans la compréhension des phénomènes motiles et du rôle joué par les différents acteurs, il ne permet pas encore de comprendre le rôle moléculaire de toutes les protéines dans l'accélération du *turnover* des filaments et leur organisation en structures efficaces pour la motilité. Cette limite n'est pas due précisément à l'essai, mais est plutôt inhérente au type de microscopie utilisée (microscopie en contraste de phase ou par fluorescence), qui ne permet pas de rendre compte dans le détail de l'état des filaments en fonction du temps. Pour améliorer la compréhension des phénomènes motiles, il est donc à ce stade essentiel de gagner en résolution pour observer en temps réel le cytosquelette d'actine à l'échelle du filament unique à l'intérieur de structures complexes de filaments d'actine.

### ***III-3/ L'observation de microfilaments d'actine individuels en vidéomicroscopie.***

#### **III-3-1/ Marquage des microfilaments à la phalloïdine fluorescente.**

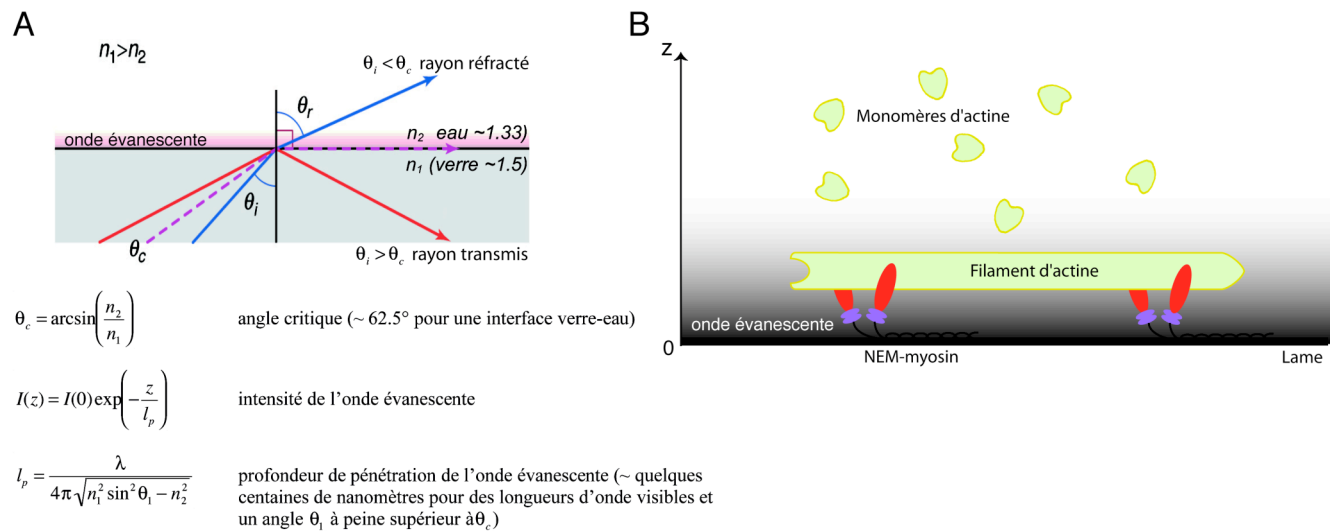
Jusqu'à récemment, les seules observations de filaments individuels d'actine étaient réalisées en microscopie électronique. Le problème de ce type de microscopie est qu'il ne permet d'obtenir que des clichés figés de filaments d'actine, mais ne permet pas d'observer leur dynamique. En 2000, Blanchoin et collaborateur ont adapté un essai utilisé pour observer le mouvement des filaments d'actine engendré par les myosines pour observer par fluorescence des filaments d'actine individuels en présence de protéines régulatrices (voir Figure 28) (Blanchoin et al., 2000a). Ceux-ci étaient marqués par un analogue fluorescent de la phalloïdine, molécule qui interagit avec les filaments d'actine tout en les empêchant de dépolymériser. La phalloïdine permet donc de diluer à faible concentration des filaments d'actine rendus fluorescents et de les observer ainsi avec un très bon rapport signal sur bruit. Le problème de cette technique est que le marquage des filaments est limité par le temps de fixation de la phalloïdine aux filaments. On ne peut donc encore une fois véritablement observer que des filaments d'actine à l'équilibre.



### **III-3-2/ Observation de microfilaments par la technique de microscopie à onde évanescente.**

Pour observer des filaments d'actine polymériser en temps réel, il devient donc nécessaire de marquer directement les monomères d'actine avec une molécule fluorescente. Cependant, avec une observation microscopique classique, l'illumination de la lampe xénon à arc excite l'ensemble des molécules fluorescentes de la solution, et le bruit de fond des monomères d'actine qui diffusent librement vient masquer la fluorescence du signal produit par les filaments d'actine. Pour éviter cela, Amann et Pollard ont eu l'idée en 2001 d'isoler optiquement les filaments d'actine qui polymérisent des monomères libres diffusants en solution (Amann and Pollard, 2001) (voir Figure 24). En localisant les filaments d'actine à la surface d'une lamelle et en les éclairant à l'aide d'une onde évanescente sur une épaisseur de seulement quelques centaines de nanomètres, ils ont pu observer les filaments polymériser tout en s'affranchissant de la fluorescence des monomères libres. Cette technique, appelée microscopie à onde évanescente (ou TIRFM pour Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) constitue dorénavant un nouvel outil très puissant pour visualiser la dynamique des filaments d'actine (Fujiwara et al., 2002), en particulier pour mesurer toutes les constantes cinétiques du filament (Kuhn and Pollard, 2005), (Kovar et al., 2006) (voir Figure 26).

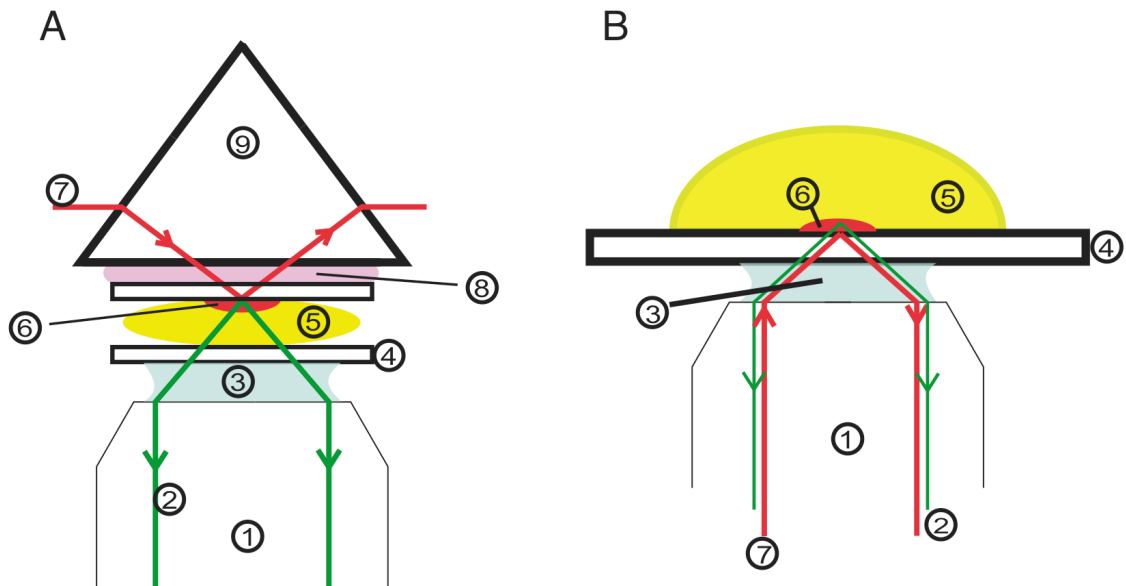
Deux types d'illuminations sont couramment employés pour créer l'onde évanescente. Dans le montage représenté sur la Figure 25A, le faisceau laser est amené directement à l'incidence voulue par l'intermédiaire d'un prisme. Le faisceau est réfléchi à l'interface entre le verre de la lame et la solution, et l'onde évanescente se propage dans le milieu aqueux. L'observation se fait par un objectif de grande ouverture numérique situé de l'autre côté de la cellule à flux. Dans le montage de la Figure 25B, le faisceau laser est envoyé directement sur le bord d'un objectif de grande ouverture numérique. Le faisceau sort de l'objectif en incidence rasante, est réfléchi à l'interface entre le verre de la lamelle et la solution, et revient dans l'objectif. L'onde évanescente est alors créée directement à l'interface de la lamelle qui est en contact avec l'objectif.



**Figure 24 : Propriétés de l'onde évanescente et fixation des filaments dans le champ évanescent.**

(A) Un faisceau laser se réfléchit totalement à l'interface entre un milieu d'indice fort (ici  $n_1$ ) et un milieu d'indice faible (ici  $n_2$ ) lorsqu'il arrive avec un angle d'incidence supérieur à l'angle critique  $\theta_c$ . Cette réflexion crée une onde évanescente qui se propage dans le milieu d'indice faible sur une épaisseur faible (quelques centaines de nanomètres seulement).

(B) La fixation des filaments d'actine fluorescents dans le champ évanescent par l'intermédiaire de myosines inactivées permet d'observer en temps réel leur dynamique tout en s'affranchissant du fond de fluorescence des monomères en solution.

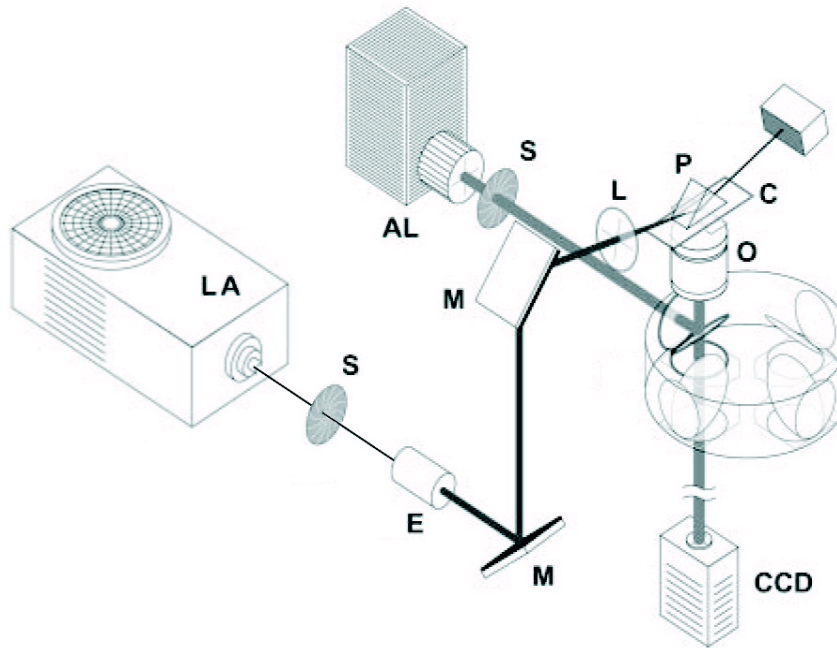


**Figure 25 : Différents types d'illumination utilisés en microscopie à onde évanescente.**

Indications (1 : objectif ; 2 : lumière émise par l'échantillon fluorescent ; 3 : huile d'immersion ; 4 : lamelle ; 5 : solution ; 6 : onde évanescente ; 7 : faisceau laser ; 8 : glycéril ; 9 : prisme).

(A) Dans le montage à prisme, le faisceau laser traverse le prisme, une épaisseur de glycéril (qui présente presque le même indice optique que le verre), et la lame avant d'être réfléchi. L'onde évanescente se crée à l'interface entre cette lame et le milieu aqueux. L'observation se fait donc en focalisant l'objectif sur la lame supérieure.

(B) Dans le montage direct, le faisceau laser est orienté sur le côté d'un objectif de microscope à grande ouverture numérique. Il est réfléchi à la surface de la lamelle avant de repartir dans l'objectif. L'onde évanescente se crée à l'interface entre cette lamelle et le milieu aqueux. L'observation se fait donc en focalisant sur la lamelle inférieure.



**Figure 26 : Principe du microscope à onde évanescente.** Abréviations (LA : laser ; S : shutter automatique ; E : élargisseur de faisceau ; M : miroirs ; L : lentille convergente ; P : prisme ; C : cellule à flux ; O : objectif du microscope ; CCD : caméra ; AL : lampe à arc). Un faisceau laser est focalisé en incidence rasante sur un prisme, à la base duquel il est réfléchi. Cette réflexion est à l'origine de l'onde évanescente fine qui se crée dans la cellule à flux. Le signal de fluorescence est récolté à travers un objectif de microscope vers une caméra CCD. (tiré de (Kuhn and Pollard, 2005)).

### III-3-3/ Limites de la microscopie à onde évanescente.

La principale limitation, inhérente à la fluorescence, vient de la résolution. D'après le critère de Rayleigh, il est impossible de séparer deux signaux fluorescents séparés d'une distance inférieure à  $\lambda/2 \approx 300 \text{ nm}$ . Par exemple, il est impossible de distinguer plusieurs filaments uniformément fluorescents à l'intérieur d'un câble de filaments d'actine. Une autre limitation de la technique vient de la géométrie de l'onde évanescente, qui condamne à faire des observations à deux dimensions dans le plan de la lame ; il est donc impossible de visualiser les structures en trois dimensions.

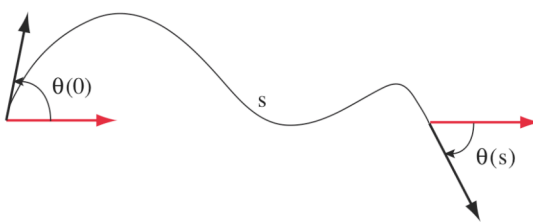
Enfin, une limitation que l'on retrouve dans la plupart des techniques biochimiques employées pour étudier la dynamique du cytosquelette d'actine, vient des concentrations en protéines à utiliser pour réaliser les expériences. En effet, l'emploi de protéines en concentrations équivalentes aux concentrations cellulaires entraîne une polymérisation extrêmement rapide de nombreux filaments d'actine. En microscopie à onde évanescente, cela se retrouve par l'apparition très rapide de nombreux filaments dans le champ d'observation. Pour observer les phénomènes à des échelles de temps correctes, il est donc nécessaire de diminuer les concentrations en protéines, en particulier la concentration d'actine.

## IV Physique du cytosquelette.

### IV-1/ Propriétés mécaniques du polymère.

#### IV-1-1/ Propriétés mécaniques d'un filament d'actine.

Tous les polymères, qu'ils soient d'origine biologique ou non, sont caractérisés par leur longueur de persistance  $L_p$ . La longueur de persistance est définie comme la longueur moyenne du polymère au-delà de laquelle, à cause des fluctuations thermiques, les orientations de ses deux extrémités ne sont plus corrélées entre elles. Plus formellement, en notant  $\theta(s)$  l'angle que fait la tangente au filament au point d'abscisse curviligne  $s$  avec un vecteur de référence, la longueur de persistance est définie par :


$$\langle \cos(\theta(s) - \theta(0)) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{2L_p}\right)$$

**Figure 27 : Définition de la longueur de persistance d'un polymère.**

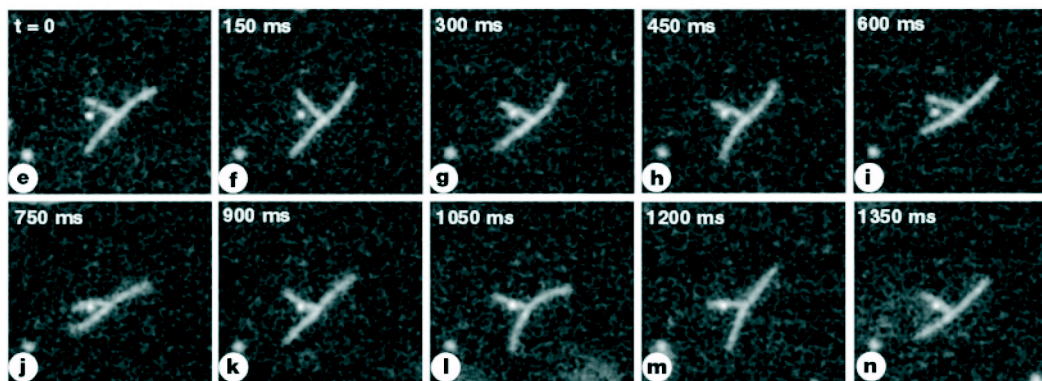
La longueur de persistance doit être mise en relation avec la longueur moyenne  $L$  des filaments du polymère. Les polymères sont dits flexibles si  $L \gg L_p$ . L'élasticité du polymère est alors de nature entropique, c'est-à-dire que sa résistance à l'extension ou à la compression est déterminée par le nombre de configurations accessibles au filament considéré comme une chaîne entropique. Ce type de polymère ne devient rigide que dans les cas de fortes extensions, où le nombre de configurations accessibles à la chaîne est très limité. A l'inverse, les polymères sont dits rigides si  $L \ll L_p$ . L'élasticité du polymère est alors de nature enthalpique, c'est-à-dire que sa résistance à l'extension ou la compression est déterminée par le module de courbure du polymère  $\kappa = L_p \cdot k_B T$ .

La longueur de persistance des filaments d'actine est d'environ 17  $\mu\text{m}$  (en comparaison, nous avons vu que la longueur de persistance des microtubules est de plusieurs millimètres). Comme cette longueur est du même ordre de grandeur que la longueur des filaments d'actine qui se trouvent dans les cellules, on considère généralement que les filaments d'actine ont une élasticité qui est à la fois de nature enthalpique et de nature entropique, et on parle ainsi de polymère semi-flexible.

#### IV-1-2/ Interactions entre filaments d'actine et réticulation.

Spontanément, il est attendu que des polymères chargés négativement tels que des filaments d'actine en solution puissent interagir entre eux et se repousser. Cependant, une présence de polycations ou de polypeptides basiques en concentrations physiologiques est suffisante pour écranter la charge des filaments d'actine. Les filaments d'actine peuvent alors interagir latéralement pour former des câbles (Tang and Janmey, 1996), (Yu and Carlsson, 2003). A une concentration en polycation optimale, Yu et Carlsson ont évalué en 2003 une énergie d'interaction entre filaments de  $-0.01$  eV par monomère, et évaluent alors une longueur critique de 59 sous-unités au-delà de laquelle la formation de câbles d'actine est thermodynamiquement favorable (Yu and Carlsson, 2003).

Suite à leur formation, les structures de câbles d'actine sont généralement stabilisées par des protéines de réticulation. Celles-ci permettent non seulement aux filaments d'actine de garder leur disposition les uns par rapport aux autres, mais elles permettent aussi aux structures de filaments d'actine de modifier leur comportement élastique. Peu d'études existent à l'échelle de la molécule individuelle pour comprendre l'influence des protéines de réticulation sur la rigidité des structures de filaments d'actine. En 2000, Blanchoin et collaborateurs ont observé les fluctuations thermiques d'un filament d'actine branché par un complexe Arp2/3 sur un filament mère (voir Figure 28 et (Blanchoin et al., 2000a)). Ils ont observé que les jonctions en Y formées par le complexe Arp2/3 étaient très rigides, et ont mesuré une élasticité rotationnelle d'environ  $10^{-19} \text{ J.rad}^{-2}$ .



**Figure 28 : Mesure de la rigidité de la branche formée par le complexe Arp2/3 par observation ultrarapide des fluctuations thermiques des filaments.** (tiré de (Blanchoin et al., 2000a)).

#### **IV-1-3/ Propriétés des gels d'actine.**

Les propriétés mécaniques des solutions d'actine filamenteuse ont été beaucoup plus étudiées à des échelles mésoscopiques, qui correspondent à l'échelle de la cellule. L'actine prend alors l'apparence d'un gel de polymère, et les propriétés rhéologiques de ces gels rendent mieux compte de la façon dont les forces sont générées et transmises dans les cellules vivantes.

A cette échelle, l'actine prend l'aspect d'un gel viscoélastique (Janmey et al., 1994), c'est-à-dire qu'il présente à la fois les propriétés de viscosité des fluides pour résister aux flux, et à la fois les propriétés élastiques des solides pour emmagasiner l'énergie lorsqu'il est contraint. La présence de protéines de réticulation permet non seulement d'organiser les filaments d'actine en structures, mais modifie également les propriétés viscoélastiques de ce gel. De nombreuses protéines de réticulation comme l' $\alpha$ -actinine ont une faible affinité pour le côté des filaments d'actine ( $K_d \sim 0.1-10 \mu\text{M}$ ) (Wachsstock et al., 1993), (Wachsstock et al., 1994). Cette particularité fait que les liaisons entre filaments d'actine créées par les protéines de réticulation sont faibles, c'est-à-dire qu'elles peuvent se rompre et se reformer facilement. En supposant que l'association de ces protéines pour le côté des filaments d'actine soit déterminée par la diffusion, on montre alors que la dissociation des liens entre filaments se fait sur une échelle de temps de l'ordre de la seconde (environ de  $0.1 \text{ s}^{-1}$  à  $50 \text{ s}^{-1}$ ) (Wachsstock et al., 1994). Par conséquent, il existe une adaptabilité du cytosquelette d'actine au type de déformation engendrée. Pour toute déformation rapide, le gel est vu comme un solide au comportement élastique, et résiste aux déformations (Xu et al., 2000), (Marcy et al., 2004). En revanche, pour toute déformation lente, les liaisons ont le temps de se réarranger, et le cytosquelette d'actine est alors simplement vu comme un fluide visqueux (Xu et al., 2000).

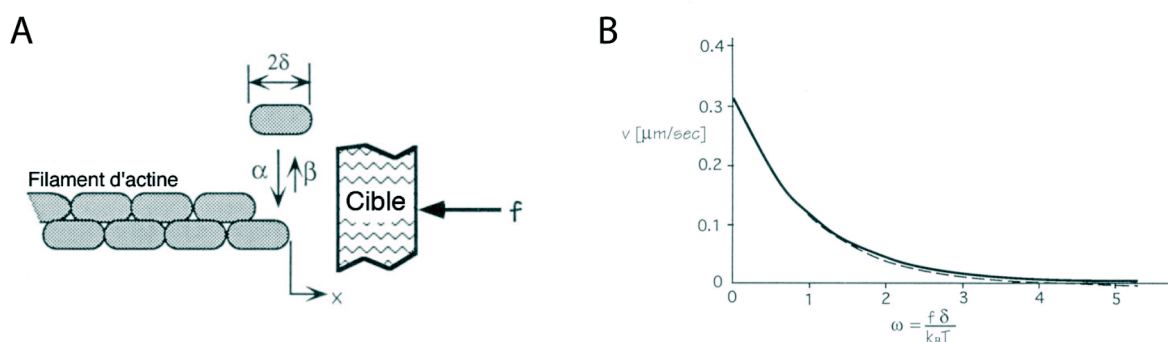
#### ***IV-2/ Forces générées par la polymérisation d'un biopolymère.***

La polymérisation d'un filament d'actine seul peut générer des forces sur une cible, même en l'absence de moteur moléculaire, comme c'est le cas au bord du lamellipode (Hill, 1981). Cette énergie provient de la variation du potentiel chimique associé à une sous-unité d'actine entre le moment où celle-ci est libre en solution et le moment où celle-ci est insérée dans le filament. Cette partie résume à l'échelle moléculaire les modèles théoriques expliquant la mécanistique exacte par laquelle se fait cette transduction, et donne des ordres de grandeur théoriques et expérimentaux.

### IV-2-1/ Origine physique de la génération de force par polymérisation de l'actine.

L'obtention de données expérimentales à propos de la polymérisation de microfilaments contre une cible rigide étant technologiquement difficile à mettre en oeuvre, les premiers résultats ont été obtenus par des modèles théoriques.

Historiquement, plusieurs modèles concurrents se sont succédés pour expliquer l'origine physique de cette force, et chaque modèle se caractérise par une relation particulière entre la force appliquée par la cible et la vitesse de polymérisation. En 1993, Peskin et collaborateurs ont proposé la théorie du cliquet brownien (Peskin et al., 1993). Même quand une force est appliquée par un objet à l'extrémité d'un filament qui polymérise, cet objet peut toujours diffuser et créer des espaces suffisants pour que des monomères puissent s'intercaler de temps en temps entre la cible et le filament (voir Figure 29A). En s'additionnant à l'extrémité, ces nouvelles sous-unités empêchent la cible de revenir en arrière. En 1996 puis en 2003, Mogilner et Oster ont ensuite amélioré le modèle en tenant compte de l'élasticité des filaments et d'un éventuel lien élastique entre les filaments et la cible (Mogilner and Oster, 1996), (Mogilner and Oster, 2003). Dans ce modèle, les fluctuations thermiques des filaments d'actine permettent de créer les espaces nécessaires à l'insertion d'une sous-unité d'actine entre l'extrémité barbée du filament et la cible (voir Figure 29A). Les auteurs prévoient avec ce modèle un comportement biphasique de la relation force-vitesse, avec des vitesses de polymérisation qui chutent rapidement à faible contrainte, mais qui décroissent beaucoup plus lentement pour des contraintes plus élevées (voir Figure 29B).



**Figure 29 : Modèle du cliquet brownien.**

(A) Le modèle du cliquet brownien suggère que les fluctuations thermiques de la cible ou du filament d'actine libèrent les espaces nécessaires à l'insertion d'une sous-unité d'actine.

(B) Allure de la relation force-vitesse pour le modèle du cliquet brownien. Le graphe représente en ordonnée la vitesse d'élongation du filament d'actine en fonction de la force adimensionnée qui lui est appliquée par la cible. (tiré de (Peskin et al., 1993)).



Par la suite, Carlsson a développé un modèle stochastique tenant compte de la géométrie des réseaux branchés (Carlsson, 2003). Il a modélisé la structure de ces réseaux pour différentes concentrations de protéines de coiffe, de complexe Arp2/3 et d'activateur du complexe Arp2/3. Il a aussi comparé la formation de ces structures pour différents modèles de fonctionnement du complexe Arp2/3, c'est-à-dire en considérant pour le complexe soit un mécanisme de nucléation simple, soit un mécanisme de nucléation autocatalytique. Ce modèle a alors permis de montrer que la prise en compte du phénomène autocatalytique permet d'obtenir des relations force-vitesse strictement constantes, c'est-à-dire que la vitesse de polymérisation du réseau branché ne dépend pas de la contrainte appliquée. Ce phénomène s'explique par un effet d'asservissement ; un ralentissement de la cible induit une augmentation de la densité en microfilaments à la surface de la cible, qui permet d'exercer une force supplémentaire rétablissant la vitesse d'origine.

Enfin, parallèlement à cela, Dickinson et collaborateurs ont émis en 2004 l'hypothèse que des protéines processives comme les formines pourraient aussi se servir de l'hydrolyse du nucléotide ATP du filament d'actine pour exercer des forces de polymérisation par filament nettement plus importantes (Dickinson et al., 2004).

#### **IV-2-2/ Données expérimentales sur la force de polymérisation exercée par un filament unique contre une cible.**

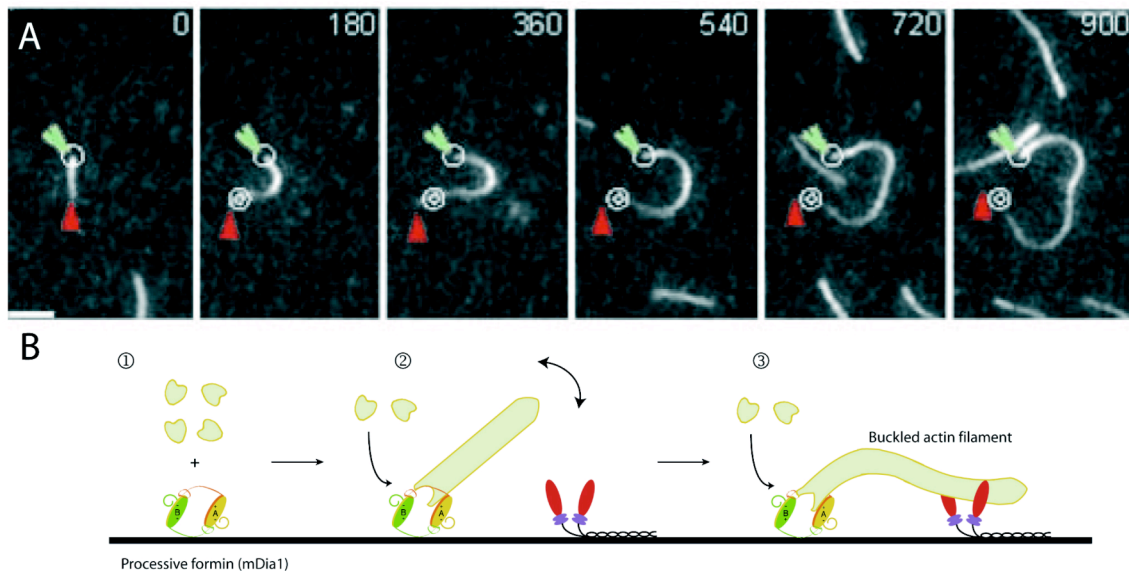
Ces dernières années, quelques expériences sur filaments uniques ont permis de vérifier ce mécanisme et d'accéder à un ordre de grandeur des forces générées par la polymérisation. En 2004, Kovar et Pollard ont utilisé le mécanisme processif de la formine mDia1 pour contraindre l'extrémité barbée d'un filament d'actine en un point fixe d'une lame de microscope (Kovar and Pollard, 2004). En maintenant simultanément le côté du filament en un autre point fixe de la lame par une myosine inactivée, ils ont montré en microscopie à onde évanesccente que l'insertion progressive de sous-unités d'actine entre la formine et l'extrémité barbée était suffisante pour induire le flambage du filament (voir Figure 30). Connaissant la formule d'Euler permettant de calculer, à partir du module de courbure d'un polymère rigide, la force nécessaire pour le faire flamber dans le cas où il y a seulement deux points d'attaches,

$$F_{\text{flambage}} = \frac{\pi^2 \cdot \kappa}{d^2}, \text{ où } d \text{ représente la distance entre les deux points fixes,}$$

et où  $\kappa = L_p \cdot k_B T$  est le module de courbure d'un filament d'actine.

ils ont pu évaluer dans chacune de leurs expériences la force générée par la polymérisation de l'actine. Ils ont alors montré que le flambage des filaments d'actine reste possible même pour des distances  $d$  aussi petites que  $0.75 \mu\text{m}$  (qui correspond à la

limite de résolution optique en dessous de laquelle on ne peut évaluer d) qui correspondent à des forces de flambage d'environ 1.3 pN. La polymérisation d'un filament unique d'actine semble donc pouvoir exercer des forces supérieures au piconewton, et ce pour des concentrations d'actine monomérique aussi basses que 0.7  $\mu\text{M}$ .



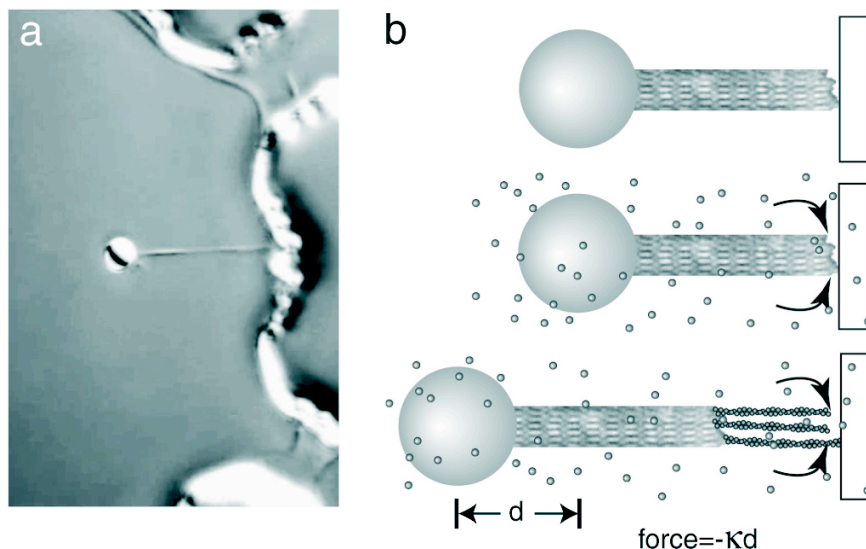
**Figure 30 :** Flambage d'un filament d'actine provoqué par le mécanisme processif de la formine mDia1.

(A) Observation en microscopie à onde évanescente d'un filament d'actine contraint en deux points fixes de la lame, à la fois par une formine mDia1 (flèche verte) à son extrémité barbée et par une myosine inactivée sur son côté (flèche rouge). Le mécanisme processif de mDia1 permet l'insertion progressive de sous-unités d'actine entre la formine et l'extrémité barbée. Le filament s'allonge tout en étant contraint en deux points fixes de la lame et flambe. (tiré de (Kovar and Pollard, 2004)).

(B) Schématisation de l'expérience.

Plus récemment, Footer et collaborateurs ont mesuré directement la force exercée par la polymérisation de quelques filaments d'actine contre une cible (Footer et al., 2007) (voir Figure 31). Pour cela, ils ont greffé sur des billes des acrosomes de sperme de *Limulus* capables d'initier en moyenne 8 filaments d'actine organisés en câble et uniformément polarisés, puis placé ces billes dans un piège optique. La polymérisation des filaments d'actine contre une cible transmet une force qui déplace la bille dans le piège optique. Les auteurs peuvent calculer en temps réel la force exercée par la polymérisation de l'actine contre la cible en mesurant le déplacement de la bille dans le piège optique (voir Figure 31). Cette étude a étonnement permis de montrer que la force exercée par la polymérisation de ces quelques filaments ne dépasse jamais la force qu'est capable d'exercer un seul filament. Il semble alors que seul le filament le plus long exerce une force en polymérisant contre la cible, les filaments d'actine ne pouvant coopérer pour exercer une force plus importante. L'organisation de filaments d'actine en

câble semble donc d'après cette étude être une organisation inefficace pour la transduction de force, sauf si éventuellement une protéine supplémentaire venait maintenir les extrémités barbées en contact avec la cible.



**Figure 31 : Mesure directe de la force générée par la polymérisation de l'actine contre une cible.** La fixation d'acrosomes permet de nucléer quelques filaments d'actine à partir d'une bille. Ces filaments organisés en câbles s'allongent au contact d'une cible, et la force exercée par la polymérisation est mesurée grâce au déplacement de la bille dans un piège optique. (tiré de (Footer et al., 2007))

#### IV-2-3/ Forces générées par un réseau de filaments d'actine.

##### *IV-2-3-1/ Mesures in vitro de la force générée par un réseau de filaments d'actine.*

Mis à part les deux expériences présentées dans le paragraphe précédent, la force exercée par la polymérisation de l'actine a été surtout étudiée à l'échelle mésoscopique. Plusieurs groupes différents ont utilisé le système modèle de motilité, basé sur la propulsion de pathogènes ou de billes de polystyrène par des réseaux de filaments d'actine formés par le complexe Arp2/3 (voir Partie III). Deux groupes ont d'abord cherché à mesurer la relation force-vitesse en faisant varier la viscosité du milieu. McGrath et collaborateurs ont montré en 2003 que la vitesse de *Listeria* décroissait rapidement à faible contrainte, puis beaucoup plus lentement pour des contraintes supérieures à 20 pN, soutenant plutôt la théorie du cliquet brownien (McGrath et al., 2003). De plus, en traquant la position de la bactérie au cours du temps, les auteurs ont pu montrer que son avancée se faisait par petits sauts correspondant à la taille d'une sous-unité d'actine. En revanche, Wiesner et collaborateurs ont obtenu des

résultats différents avec un essai de motilité réalisé à partir de billes de polystyrène et de protéines purifiées (Wiesner et al., 2003). La relation force-vitesse est environ constante dans ces expériences, soutenant plutôt le modèle autocatalytique de Carlsson.

#### ***IV-2-3-2/ L'essai de motilité à l'échelle mésoscopique.***

Nous avons vu qu'à l'échelle mésoscopique, l'ensemble des microfilaments d'actine prennent l'apparence d'un gel de polymère. Un dernier modèle, initié par Noireaux et collaborateurs en 2000, se sert des propriétés mécaniques des gels pour expliquer à cette échelle les forces induites par la polymérisation de l'actine (Noireaux et al., 2000). A l'interface entre le gel d'actine et la cible, la polymérisation de l'actine crée des contraintes qui se libèrent en poussant la cible (Gerbal et al. 2000), (Plastino and Sykes, 2005).

Le mécanisme de propulsion peut être compris si l'on regarde la géométrie des contraintes qui s'exercent sur la cible. Dans plusieurs études, les auteurs ont remplacé dans l'essai reconstitué de motilité les billes de polystyrène par des gouttelettes lipidiques (Upadhyaya et al., 2003), (Giardini et al., 2003), (Boukellal et al., 2004), (Trichet et al., 2007). Au cours du mouvement, la forme prise par la gouttelette lipidique indique la façon dont s'exercent les contraintes normales à la surface de la gouttelette. Deux types de contraintes apparaissent dans ces études ; simultanément, la comète d'actine comprime les côtés et tire à l'arrière de la gouttelette. L'ensemble de ces deux contraintes est appelé force élastique. A ces contraintes s'ajoute une force de friction latérale entre la bille et le gel d'actine. Au cours de la polymérisation, Giardini et al. ont évalué que 90% des forces induites par la polymérisation de l'actine s'exercent perpendiculairement au sens du mouvement, alors que seulement 10% s'exercent dans le sens du mouvement. Le mouvement se fait ensuite de manière cyclique. Dans un premier temps, la polymérisation de l'actine augmente les forces élastiques qui sont compensées par les forces de friction. Dans un second temps, les forces élastiques se mettent à devenir supérieures aux forces de friction. La friction diminue donc soudainement et la bille est propulsée vers l'avant. Il en résulte que dans certaines conditions particulières, le mouvement des billes apparaît de manière saccadée (Bernheim-Groswasser et al., 2002), (Bernheim-Groswasser et al., 2005)). Ce mouvement non-linéaire de la bille ne peut être expliqué par aucune théorie non-élastique (Plastino and Sykes, 2005), (Mogilner, 2006).

Ce modèle de propulsion élastique donne théoriquement une relation force-vitesse décroissante de façon convexe, et prévoit qu'il faut des forces de l'ordre de quelques nanonewton pour limiter la polymérisation, un comportement qui a été vérifié expérimentalement par micromanipulation (Marcy et al., 2004).

Enfin, en 2005, Parekh et collaborateurs ont utilisé un protocole très innovant pour mesurer la relation force-vitesse (Parekh et al., 2005). Les auteurs ont mesuré par microscopie à force atomique la force exercée par la polymérisation d'un réseau branché de filaments d'actine sur un cantilever. Ils ont obtenu des résultats vraiment étonnants, où la relation force-vitesse reste constante jusqu'à des valeurs relativement importantes de la force, avant de décroître de façon concave. De plus, plusieurs vitesses de croissance stables sont possibles pour une même force appliquée, indiquant que la relation force-vitesse n'est peut-être pas simplement suffisante pour décrire tout le comportement du système, mais que la vitesse de polymérisation pourrait bien dépendre non seulement de la force appliquée à un instant donné, mais aussi des forces appliquées préalablement au système.

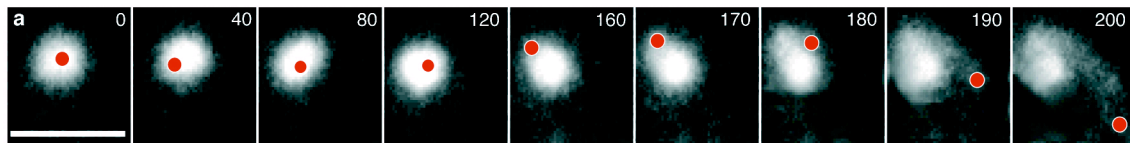
#### ***IV-2-3-3/ Qu'en est-il in vivo au bord du lamellipode ?***

En 2006, Prass et collaborateurs se sont intéressés à la force nécessaire pour ralentir ou arrêter la progression d'un lamellipode (Prass et al., 2006). Pour cela, les auteurs ont placé un cantilever sur le parcours d'un lamellipode, et ont mesuré la relation force-vitesse correspondante. Les résultats obtenus sont voisins de ceux obtenus par Parekh et collaborateurs, à savoir que la progression du lamellipode est relativement insensible aux faibles contraintes (jusqu'à 0.4 nN par  $\mu\text{m}$  de lamellipode), alors que le profil force-vitesse décroît avec un profil concave pour des contraintes plus élevées.

#### **IV-2-4/ Essai de motilité et brisure de symétrie.**

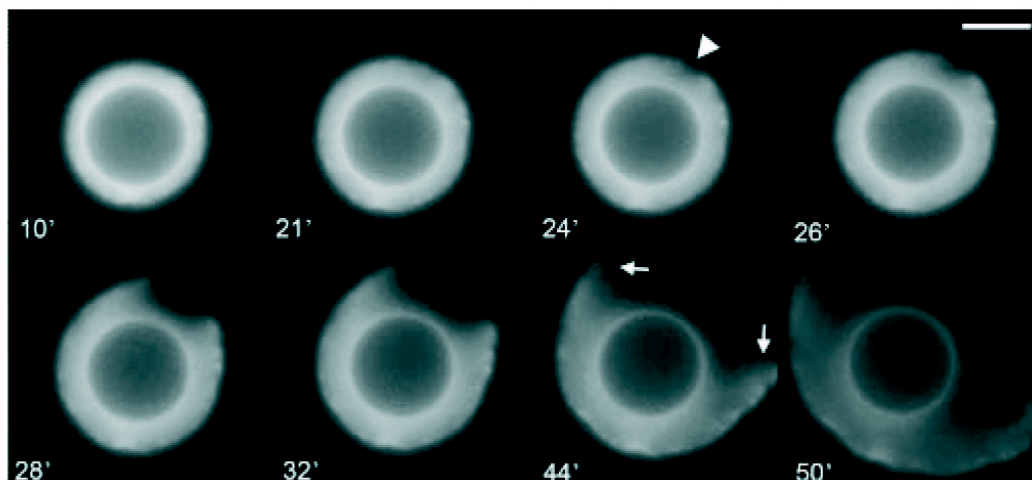
Dans un milieu de motilité, le nuage d'actine qui polymérise autour de la bille doit parvenir à se polariser en une comète d'actine pour que la bille puisse commencer à se déplacer. Ce phénomène, appelé brisure de symétrie, peut s'expliquer soit par le modèle du cliquet brownien, soit par le modèle de la propulsion élastique.

Pour expliquer cette transition, le modèle du cliquet brownien suppose à un instant donné un déséquilibre entre différentes zones de la bille (van Oudenaarden and Theriot, 1999). Supposons qu'à un instant donné, la densité en filament soit légèrement supérieure d'un côté de la bille par rapport à l'autre côté. Les filaments du côté le plus dense vont coopérer pour pousser la bille, et par conséquent, les filaments de l'autre côté de la bille vont s'allonger moins rapidement. Au final, il va se créer un déséquilibre entre les deux côtés de la bille qui s'amplifiera progressivement jusqu'à ce que la bille se mette en mouvement (voir Figure 32).



**Figure 32 : Brisure de symétrie dans un nuage de filaments d'actine par le modèle du cliquet brownien.** Mouvement de la bille (en rouge) dans un essai reconstitué de motilité avant et pendant que celle-ci s'échappe du nuage d'actine. Jusqu'à  $t = 180$  s, les forces exercées par les filaments d'actine sur les différentes parties autour de la bille fluctuent, mais se compensent en moyenne. Après  $t = 180$  s, les forces exercées par le nuage sur un côté de la bille deviennent suffisamment importantes pour chasser la bille du nuage, briser la symétrie, et lancer le mouvement directionnel. (tiré de (van Oudenaarden and Theriot, 1999)).

Dans le modèle de la propulsion élastique, l'actine polymérise au contact de la bille et repousse donc les couches de gel d'actine vers l'extérieur. Les couches de gel à l'extérieur du nuage d'actine sont donc celles qui sont soumises à la plus forte contrainte tangentielle. Celle-ci augmente jusqu'à ce que le nuage se déchire à un endroit particulièrement faible et lance la brisure de symétrie (voir Figure 33).



**Figure 33 : Brisure de symétrie dans un nuage de filaments d'actine par le modèle du gel élastique.** La polymérisation de l'actine au contact de la bille forme un nuage dense de filaments branchés. A l'extérieur du nuage, le réseau de filament est soumis à une tension de plus en plus forte au fur et à mesure que le gel s'épaissit. Quand la tension devient trop forte, le gel rompt, la symétrie est brisée. (tiré de (van der Gucht et al., 2005)).



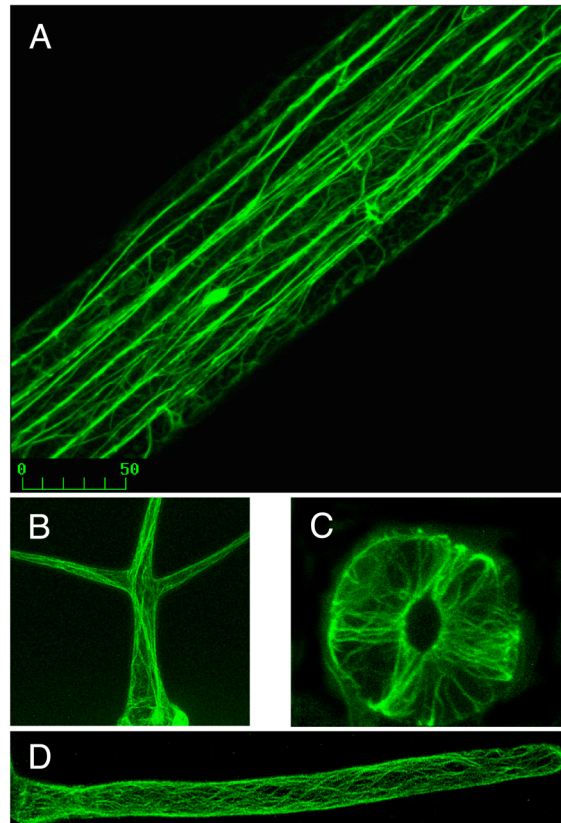
# **POSITION DU SUJET**



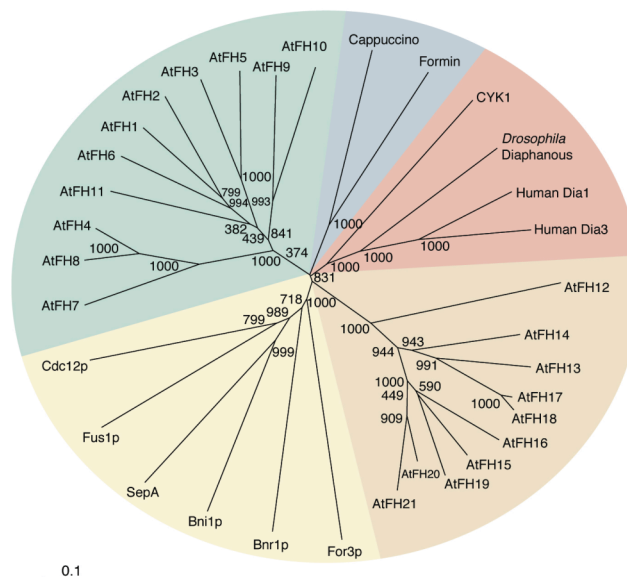


### ***I/ Caractérisation du mécanisme de nucléation d'*Arabidopsis thaliana* FORMIN1. Conséquences pour la formation des câbles d'actine in vitro.***

La découverte d'un facteur de nucléation de l'actine est un événement majeur lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes moléculaires contrôlant la dynamique de l'actine. Le premier facteur de nucléation, le complexe Arp2/3 a été découvert en 1994 (Machesky et al., 1994). Au cours des 10 dernières années, un grand nombre de travaux a eu pour objectif de comprendre son mode d'action (Pollard et al., 2000). Le complexe Arp2/3 est essentiel chez tous les organismes dans lesquels il a été étudié (sauf chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Deeks et al., 2002)). Peu avant le début de ma thèse un deuxième facteur de nucléation a été identifié : la famille des formines (Sagot et al., 2002b), (Evangelista et al., 2002). Les formines ont été montrées pour être notamment responsables de la formation des câbles de filaments d'actine chez la levure (Sagot et al., 2002a), (Feierbach and Chang, 2001). Chez la plante, les câbles de filaments d'actine représentent la structure la plus abondamment trouvée dans de nombreux types cellulaires (voir Figure 34), au contraire des réseaux branchés de filaments d'actine qui n'ont jamais été mis en évidence. La famille des formines chez la plante est particulièrement diverse, puisque l'on distingue dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* pas moins de 21 isoformes de formines (voir Figure 35). Une autre particularité de la plante est que la famille des formines peut être divisée en deux classes, suivant que les formines possèdent un domaine trans-membranaire prédit (classe I) ou non (classe II) (Cvrckova, 2000), (Deeks et al., 2002), (Cvrckova et al., 2004) (voir Figure 35).



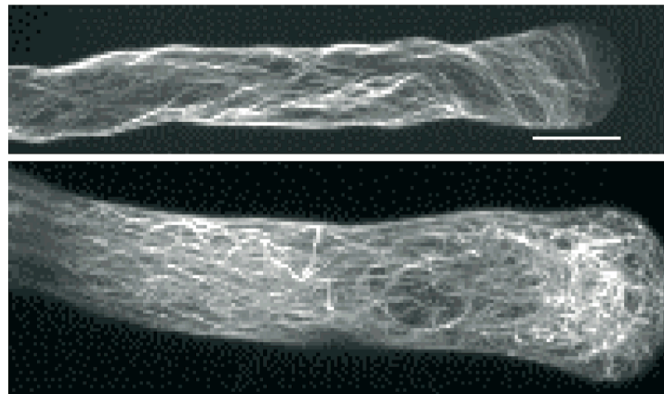
**Figure 34 : Visualisation du cytosquelette d'actine chez la plante dans différents types cellulaires.** L'actine est marquée à la GFP dans (A) une cellule de l'épiderme, (B) un trichome, (C) un stomate et (D) un poil absorbant. (tiré de (Dong et al., 2001)).



**Figure 35 : Arbre phylogénique des formines.** Cet arbre a été obtenu à partir d'un alignement de séquence des domaines FH2. La phylogénie peut se diviser en plusieurs sous-groupes : en vert, les formines de classe I d'*Arabidopsis* ; en bleu le sous-groupe des formines d'animaux ; en rouge, le sous-groupe des formines Diaphanous ; en marron, les formines de classe II d'*Arabidopsis* ; en jaune, les formines de levure. (tiré de (Deeks et al., 2002)).

## Position du sujet

Toutes ces évidences nous ont conduit à penser que l'étude de la famille des formines de plante constituerait un bon système modèle pour comprendre la dynamique de formation des câbles d'actine. La première étape de ce projet a consisté en l'étude biochimique d'un isoforme de formine de plante, la FORMIN1. Cet isoforme fut choisi parce que des données obtenues *in vivo* par Cheung et Wu montraient que la surexpression de FORMIN1 dans le tube pollinique induisait la formation de très nombreux câbles supplémentaires de filaments d'actine (voir Figure 36 et (Cheung and Wu, 2004)).



**Figure 36 : La surexpression de FORMIN1 dans le tube pollinique induit la formation de très nombreux câbles de filaments d'actine supplémentaires.** Le cliché du haut représente un tube pollinique transformé par Lat52 :GFP-mTalin (1 µg) pour marquer les filaments d'actine. Le cliché du bas représente un tube pollinique transformé par Lat52:GFP-mTalin (1 µg) + Lat52:[FH1FH2] (5 µg). Echelle : 10 µm. (tiré de (Cheung and Wu, 2004)).

Plusieurs questions se posaient avant de commencer cette étude, parmi lesquelles :

- i/ Les formines de plantes sont-elles aussi capables de nucléer la polymérisation de l'actine, que ce soit en présence ou en absence de profiline ?
- ii/ Quel est le rôle respectif des domaines FH1 et FH2 vis-à-vis de l'activité de nucléation des formines de plante ?
- iii/ Le mécanisme moléculaire des formines de plante est-il comparable à celui des formines présentes chez les autres eucaryotes ?
- iv/ Les formines de plantes possèderaient-elles des activités biochimiques supplémentaires, en particulier des propriétés pouvant expliquer leur rôle pour la formation de câbles de filaments d'actine ?

Dans un premier temps, l'étude de la FORMIN1 s'est basée principalement sur des techniques biochimiques telles que l'enregistrement de cinétiques de polymérisation en fluorimétrie à l'aide de l'actine marquée au pyrène, la diffusion de la lumière ou l'observation de structures de filaments d'actine à l'état stationnaire. Cependant, ce type

de technique montre rapidement des limites pour l'étude des phénomènes biochimiques complexes. Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire d'une protéine interagissant avec l'actine, il nous a semblé nécessaire de pouvoir observer son effet en temps réel sur l'actine à l'échelle du filament unique. J'ai donc dû développer un système de microscopie à onde évanescente, seule technique adaptée à l'observation en temps réel de la polymérisation de filaments d'actine.

Nous avons poursuivi ce projet avec pour objectif de faire le lien entre activité biochimique de FORMIN1 et mécanisme possible de formation des câbles d'actine engendrés par les formines et de pouvoir ainsi envisager une reconstitution *in vitro* de la dynamique de formation des câbles. Cette partie du projet souleva progressivement de nombreuses questions parmi lesquelles :

i/ Quel est le jeu minimum de protéines permettant la formation de câbles d'actine directement à partir d'actine monomérique ? FORMIN1 pourrait-elle être suffisante où y a-t-il besoin d'autres partenaires protéiques ?

ii/ Par quel mécanisme les filaments individuels peuvent-ils s'organiser pour former les structures complexes de câbles d'actine ?

iii/ Quelle est la géométrie des câbles de filaments d'actine engendrés par FORMIN1, en particulier, avec quelle polarité les filaments sont-ils organisés ?

Une des originalités de ce projet est d'avoir utilisé pour la première fois la technique de microscopie à onde évanescente non seulement pour mesurer l'effet d'une protéine sur la dynamique de polymérisation de filament d'actine individuel, mais surtout pour comprendre les mécanismes d'organisation des filaments d'actine en structures organisées plus complexes.

### ***II/ Accélération du turnover des filaments d'actine par l'ADF/cofiline. Conséquences pour la formation des câbles d'actine.***

Suite à l'étude de la dynamique de formation des câbles de filaments d'actine par la FORMIN1, le projet s'est orienté sur les mécanismes contrôlant la dynamique (assemblage/désassemblage) de filaments d'actine induite par l'ADF/cofiline, et sur le rôle particulier de l'ADF/cofiline sur l'accélération du turnover de l'actine. En effet, de très nombreuses études parlent de la dynamique de filaments d'actine individuels mais jamais personne n'a pu observer cette dynamique en temps réel à l'échelle du filament individuel.

## Position du sujet

Bien que la littérature soit particulièrement riche à propos de l'ADF/cofiline, très peu de choses sont connues à l'échelle moléculaire sur le mécanisme utilisé par l'ADF/cofiline pour désassembler les filaments d'actine individuels, et les résultats présentés dans la littérature sont souvent contradictoires. Puisque la technique de microscopie à onde évanescence permet aujourd'hui de visualiser le comportement des filaments d'actine à l'échelle individuelle, il nous a paru essentiel d'utiliser cette technique pour réétudier l'effet de l'ADF/cofiline sur des filaments individuels, puis sur des structures plus complexes telles que les câbles de filaments d'actine. En particulier, les questions auxquelles nous souhaitions répondre étaient :

i/ Par quel mécanisme l'ADF/cofiline dépolymérise-t-elle les filaments d'actine individuels ? Quel est le rôle joué par la nature du nucléotide des sous-unités d'actine du filament ?

ii/ Ce mécanisme permet-il d'expliquer à l'échelle du filament individuel l'accélération du *turnover* observée *in vivo* ?

iii/ Le modèle du tapis roulant dans le lamellipode impose que la polymérisation à la membrane soit exactement compensée par le désassemblage du polymère à l'arrière du lamellipode. Comment la polymérisation rapide à l'extrémité barbée et le désassemblage rapide à l'extrémité pointue peuvent-ils être exactement synchronisés pour maintenir un réseau de filaments de longueur moyenne constante ?

iv/ Romero et collaborateurs ont montré que la formine mDia1 pouvait en présence de profiline accélérer la vitesse d'élongation des filaments d'actine. L'ADF/cofiline est-elle capable de désassembler aussi rapidement ces filaments ? Si oui, quelle augmentation de la vitesse du *turnover* de l'actine est-il possible de mesurer à l'échelle du filament individuel ?

v/ Comment se comportent les structures plus complexes de filaments d'actine tels que les câbles de filaments en présence d'ADF/cofiline ?

Enfin, puisque l'actine, l'ADF/cofiline et la profiline sont les seules protéines nécessaires à la motilité efficace de billes possédant en surface le facteur de nucléation mDia1 (Romero et al., 2004), nous avons voulu savoir si cet essai était adaptable à la technique de microscopie à onde évanescence, avec pour but ultime d'observer le comportement individuel des filaments d'actine autour des billes au cours des phénomènes motiles. Nous avons essayé de répondre aux questions suivantes :

i/ Est-il possible d'observer la polymérisation localisée de l'actine en microscopie à onde évanescence, en utilisant les billes greffées avec les formines ?

ii/ Peut-on observer le comportement dynamique des filaments d'actine à l'échelle du filament individuel autour des billes ?

iii/ Est-il possible de former des câbles épais de filaments autour des billes en microscopie à onde évanescence ? Peut-on alors observer des comportements motiles ?

iv/ La visualisation de la dynamique des filaments d'actine individuels dans l'essai reconstitué de motilité permet-elle d'émettre des hypothèses quant au mécanisme conduisant à la brisure de symétrie dans les nuages d'actine autour des billes ?

# RESULTATS





***Article 1 : Le domaine FH1 (Formin Homology 1 Domain) module l'activité de nucléation et de formation de câbles d'actine d'Arabidopsis FORMIN1.***

**Alphée Michelot\*, Christophe Guérin\*, Shanjin Huang\*, Mathieu Ingouff, Stéphane Richard, Natalia Rodiuc, Christopher J. Staiger\*, et Laurent Blanchoin\*.**

\* co-premiers auteurs

+ co-correspondants

**Résumé :**

Chez les eucaryotes, la majorité des phénomènes motiles impliquent le cytosquelette d'actine. Une question fondamentale en biologie est donc de comprendre comment les cellules vivantes forment les filaments d'actine, puis les organisent en structures ordonnées. La formation de nouveaux filaments à partir d'une réserve d'actine monomérique complexée à la profiline n'est pas spontanée, mais requiert la présence de protéines appelées facteurs de nucléation de l'actine. Le facteur de nucléation de l'actine le mieux connu à ce jour est le complexe Arp2/3, un complexe de sept sous-unités stables et hautement conservées, qui a été montré comme étant un facteur essentiel de la nucléation de l'actine chez de nombreux eucaryotes. Le complexe Arp2/3 est responsable de la formation de réseaux branchés de filaments d'actine.

Cependant, chez les plantes, l'analyse du génome d' *Arabidopsis thaliana* a révélé la présence d'orthologues pour les sept sous-unités du complexe Arp2/3, mais la mutation de plusieurs sous-unités du complexe a montré uniquement des défauts morphologiques mineurs dans quelques cellules spécialisées de la plante, telles que les trichomes (Deeks et al., 2002). De plus, l'observation des filaments d'actine chez la plante n'a jamais permis de révéler la présence de réseaux branchés de filaments d'actine, mais en revanche, a révélé la présence de nombreux câbles de filaments d'actine. La façon dont les filaments d'actine sont initiés chez la plante reste donc inconnue. Une des hypothèses de travail serait que les filaments d'actine sont majoritairement initiés par les formines chez les plantes. En effet, le génome

d'*Arabidopsis thaliana* possède 21 séquences de gènes codant pour les formines. Les formines ont été montrés en 2001 comme étant des facteurs de nucléation de l'actine jouant un rôle primordial pour la formation des câbles d'actine (Sagot et al., 2002b), (Evangelista et al., 2002). De plus, la surexpression de FORMIN1 dans le tube pollinique d'*Arabidopsis thaliana* induit la formation de très nombreux câbles de filaments d'actine supplémentaires (Cheung and Wu, 2004). L'étude de l'isoforme FORMIN1 d'*Arabidopsis thaliana* est donc apparue comme importante pour comprendre le rôle des formines de plante sur la nucléation des filaments d'actine, et pour envisager de comprendre leur rôle sur la formation des câbles d'actine.

Les formines sont caractérisées par la présence de deux domaines FH1 et FH2. Le domaine FH2 est un domaine qui interagit avec l'actine, alors que le domaine FH1 est un domaine riche en séquences de proline qui interagit avec la profiline (Sagot et al., 2002b), (Kovar et al., 2003), (Li and Higgs, 2003). Chez les autres organismes que la plante, le domaine FH2 seul est capable de nucléer la polymérisation de l'actine, interagit avec les extrémités barbées des filaments, et ralentit ou bloque l'élongation de ces extrémités (Sagot et al., 2002b), (Pruyne et al., 2002), (Kovar et al., 2003), (Harris et al., 2004). En présence de profiline, le domaine FH2 seul est incapable d'initier la polymérisation de filament d'actine. Pour avoir une nucléation efficace en présence de profiline, la présence du domaine FH1 est nécessaire en plus du domaine FH2. De plus, la présence du domaine FH1 et de profiline augmente la vitesse d'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine en présence de certaines formines (Romero et al., 2004), (Kovar et al., 2006). Le mécanisme le plus couramment admis pour expliquer la variation des vitesses d'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine en présence de formines est un mécanisme dit processif, c'est-à-dire que les formines se déplacent en "marchant" à l'extrémité barbée des filaments d'actine, en insérant progressivement des sous-unités d'actine au cours de la polymérisation. Une conséquence de ce mécanisme est que les formines protègent les extrémités barbées des filaments d'actine de l'action des protéines de coiffe (Zigmond et al., 2003), (Moseley et al., 2004).

Dans cette première étude, nous avons combiné des expériences de cinétiques de polymérisation (par fluorescence au pyrène ou par diffusion de la lumière) avec des expériences de microscopie (à l'état stationnaire ou en temps réel par microscopie à onde évanescente) pour analyser les effets de FORMIN1 sur la dynamique de polymérisation des filaments d'actine. Nous avons réalisé deux constructions de la protéine en vue d'exprimer de façon recombinante deux domaines, une construction possédant le domaine FH2 seul, et une construction possédant les deux domaines FH1 et FH2. Comme pour les formines issues d'autres organismes, les deux constructions protéiques une fois purifiées sont capables de nucléer la polymérisation de l'actine, et, la présence du domaine FH1 est nécessaire pour initier la polymérisation de l'actine en

présence de profiline. Cependant, le domaine FH2 seul agit comme une protéine de coiffe qui bloque l'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine (et ce même en absence de profiline) et initie la polymérisation des filaments à leur extrémité pointue en accord avec la structure du domaine FH2 lié à l'actine (Otomo et al., 2005b). La présence du domaine FH1 permet à FORMIN1 de générer de nouveaux filaments d'actine s'allongeant à leur extrémité barbée. Nous suggérons dans cet article que la présence du domaine FH1 induise un changement de conformation du domaine FH2, qui modifierait l'affinité de FORMIN1 pour l'extrémité barbée des filaments d'actine. La présence du domaine FH1 de FORMIN1 permet à la protéine de passer d'un fort pouvoir de coiffe (*strong capping*) avec une forte affinité pour l'extrémité barbée ( $K_d \approx 3.7 \text{ nM}$ ) des filaments d'actine à un faible pouvoir de coiffe (*leaky capping*) avec une faible affinité ( $K_d \approx 40 \text{ nM}$ ) pour les extrémités barbées des filaments d'actine. Un autre comportement particulier à FORMIN1 est que cette formine ne protège pas les extrémités barbées contre leur blocage par les protéines de coiffe comme l'ensemble des autres formines testées auparavant (Sagot et al., 2002b), (Kovar et al., 2003), (Li and Higgs, 2003). Ce résultat est en faveur d'une hypothèse selon laquelle FORMIN1 ne resterait pas liée de façon continue aux extrémités barbées des filaments d'actine, permettant ainsi leur élongation. Enfin, cette étude nous a permis de rapporter pour la première fois qu'une formine est capable d'interagir avec une forte affinité pour le côté des filaments d'actine ( $K_d \approx 130 \text{ nM}$ ) sans aucun autre partenaire, et ainsi d'organiser les filaments d'actine en structures organisées de filaments parallèles, appelés câbles d'actine. Cette propriété requiert la présence du domaine FH1 ; le domaine FH2 seul ne permet que la formation de filaments uniques. Plusieurs études ont depuis relevé la capacité de certaines autres formines à former des câbles de filaments d'actine (Bnr1, mDia2, FRL1), avec des affinités pour le côté du filament très variables (Moseley and Goode, 2005), (Harris et al., 2006).



# ARTICLE 1



# The Formin Homology 1 Domain Modulates the Actin Nucleation and Bundling Activity of Arabidopsis FORMIN1 <sup>W</sup>

Alphée Michelot,<sup>a,1</sup> Christophe Guérin,<sup>a,1</sup> Shanjin Huang,<sup>b,1</sup> Mathieu Ingouff,<sup>a</sup> Stéphane Richard,<sup>c</sup> Natalia Rodiuc,<sup>a</sup> Christopher J. Staiger,<sup>b,2</sup> and Laurent Blanchoin<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Joseph Fourier, Unité Mixte de Recherche 5168, F38054, Grenoble, France

<sup>b</sup>Department of Biological Sciences and Bindley Bioscience Center, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907-2064

<sup>c</sup>Salk Institute, Structural Biology Laboratory, La Jolla, California 92037

**The organization of actin filaments into large ordered structures is a tightly controlled feature of many cellular processes. However, the mechanisms by which actin filament polymerization is initiated from the available pool of profilin-bound actin monomers remain unknown in plants. Because the spontaneous polymerization of actin monomers bound to profilin is inhibited, the intervention of an actin promoting factor is required for efficient actin polymerization. Two such factors have been characterized from yeasts and metazoans: the Arp2/3 complex, a complex of seven highly conserved subunits including two actin-related proteins (ARP2 and ARP3), and the FORMIN family of proteins. The recent finding that *Arabidopsis thaliana* plants lacking a functional Arp2/3 complex exhibit rather modest morphological defects leads us to consider whether the large FORMIN family plays a central role in the regulation of actin polymerization. Here, we have characterized the mechanism of action of Arabidopsis FORMIN1 (AFH1). Overexpression of AFH1 in pollen tubes has been shown previously to induce abnormal actin cable formation. We demonstrate that AFH1 has a unique behavior when compared with nonplant formins. The activity of the formin homology domain 2 (FH2), containing the actin binding activity, is modulated by the formin homology domain 1 (FH1). Indeed, the presence of the FH1 domain switches the FH2 domain from a tight capper ( $K_d \sim 3.7$  nM) able to nucleate actin filaments that grow only in the pointed-end direction to a leaky capper that allows barbed-end elongation and efficient nucleation of actin filaments from actin monomers bound to profilin. Another exciting feature of AFH1 is its ability to bind to the side and bundle actin filaments. We have identified an actin nucleator that is able to organize actin filaments directly into unbranched actin filament bundles. We suggest that AFH1 plays a central role in the initiation and organization of actin cables from the pool of actin monomers bound to profilin.**

## INTRODUCTION

In plants, the cytoskeleton (i.e., microtubules and actin filaments) has long been known to play a major role in specialized functions during cell division, cell expansion and morphogenesis, or in response to pathogen attack (Staiger, 2000; Wasteneys and Galway, 2003; Staiger and Hussey, 2004; Wasteneys and Yang, 2004). Plant cells respond to a wide range of internal or external stimuli by reorganizing their cytoplasm (Vantard and Blanchoin, 2002). These modifications often correlate with changes in the actin filament network, suggesting a direct correlation between signal transduction and actin cytoskeleton reorganization in plants (Staiger and Hussey, 2004). Despite growing evidence

that signal transduction cascades are required for plants to link signaling to the actin cytoskeleton, such signaling pathways have not yet been fully elucidated.

The elongation of the pollen tube is one of the best-characterized examples of actin-based cellular morphogenesis in plants (Hepler et al., 2001; Holdaway-Clarke and Hepler, 2003; Wasteneys and Galway, 2003). Fast pollen tube elongation (up to 1 cm/h for maize [*Zea mays*] pollen growing in vivo) allows fertilization of the ovule over a long distance in periods of <24 h. Actin is one of the most abundant proteins in pollen and plays a major role during tip growth (Yen et al., 1995; Ren et al., 1997; Staiger and Hussey, 2004). Any perturbation of the actin cytoskeleton by overexpression of actin binding proteins, drug treatments, or antibody injection into pollen induces morphological defects and often arrests tip growth (Lin and Yang, 1997; Gibbon et al., 1999; Vidali et al., 2001; Chen et al., 2002). However, how actin binding proteins are coordinated to ensure correct behavior of the actin cytoskeleton during pollen tube growth is an open debate.

A major long-standing challenge in plant biology is to understand how cells initiate actin filaments and thereby generate new actin filament arrays. Two main reasons argue against the spontaneous polymerization of actin filaments in plants. First, the need for precise spatial and temporal control over actin

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

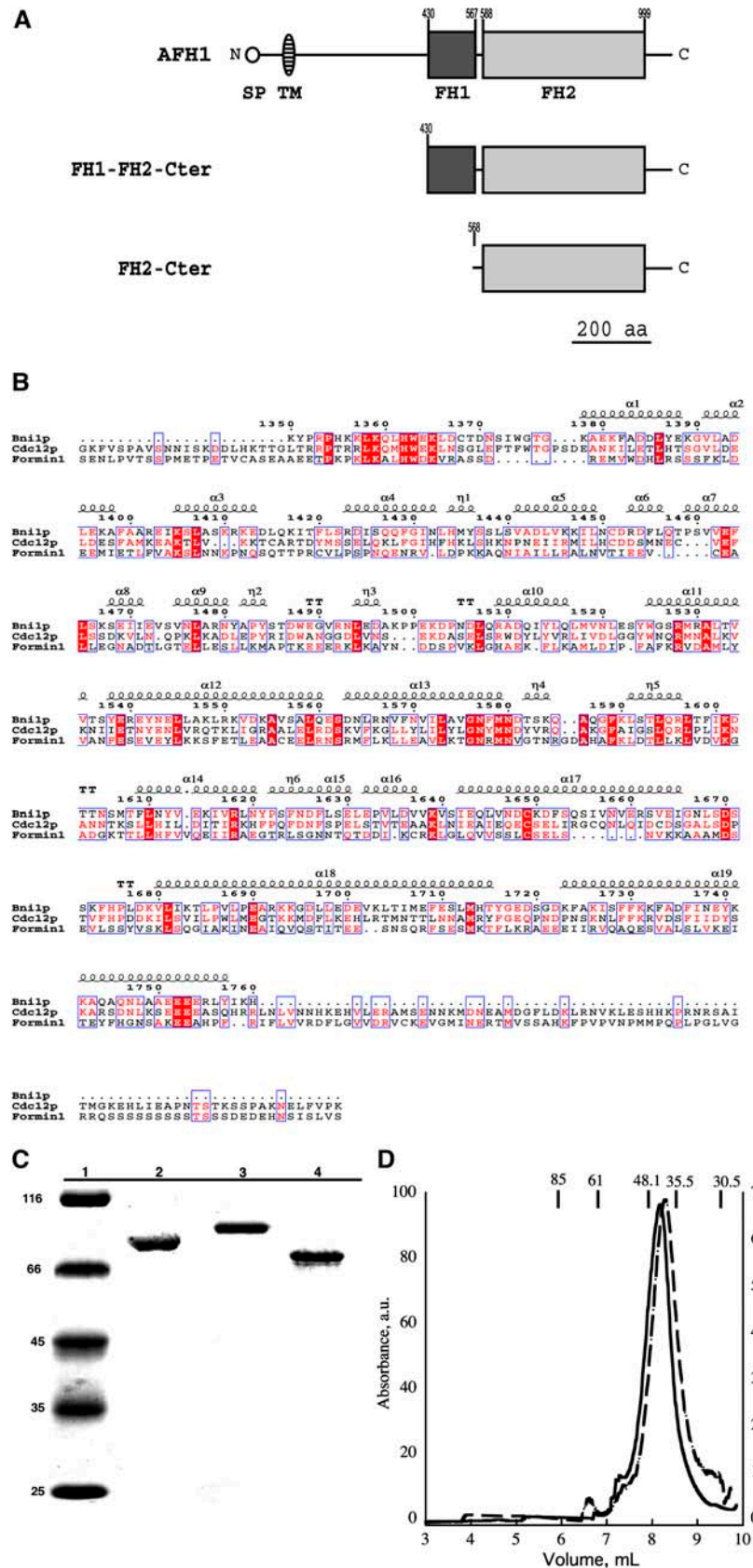
<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail cstaiger@bilbo.bio.purdue.edu or laurent.blanchoin@cea.fr; fax 765-496-1496 or 33-4-38785091.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Laurent Blanchoin (laurent.blanchoin@cea.fr).

<sup>W</sup>Online version contains Web-only data.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.105.030908.





**Figure 1.** Purification of AFH1 and FH1-FH2-Cter and FH2-Cter Fusion Proteins.

polymerization in all cellular processes seems obvious. Indeed, cellular disruption of the equilibrium between actin monomers and actin filaments by overexpression of actin binding proteins or using actin cytoskeleton drugs (e.g., latrunculin or phalloidin) induces morphological and cytoarchitectural defects in plant cells (Staiger et al., 1994; Gibbon et al., 1999; Szymanski et al., 1999; Vidali et al., 2001). Second, the high in vivo concentration of profilin will buffer any free actin monomers and eliminate spontaneous formation of new filaments (Gibbon et al., 1997; Snowman et al., 2002; Staiger and Hussey, 2004). In fact, binding of profilin to ATP-actin monomers inhibits the formation of actin dimers or trimers, essential intermediates for the formation of actin filaments (Pollard et al., 2000).

The polymerization of actin in a plant cell, like other eukaryotes, will therefore require the intervention of actin-nucleating factors (Pollard et al., 2000; Staiger, 2000). Two actin-promoting factors are known: the Arp2/3 complex originally purified from *Acanthamoeba castellanii* (Machesky et al., 1994) and formins identified as a link between Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis in yeast (Evangelista et al., 1997). The Arp2/3 complex generates a branched network of actin filaments (Mullins et al., 1998), whereas formins induce polymerization of actin filaments organized into parallel cables (Feierbach and Chang, 2001; Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002a). Analysis of the *Arabidopsis thaliana* genome reveals the presence of orthologs for all seven subunits of the Arp2/3 complex (Deeks and Hussey, 2003; Smith and Li, 2004). However, *Arabidopsis* plants defective in the expression of several of the subunits show morphological and cytological defects only in specialized cell types, including trichomes, leaf pavement cells, and root hairs (Li et al., 2002; Le et al., 2003; Mathur et al., 2003a, 2003b). One hypothesis arising from these surprising results is that actin polymerization in plant cells is mainly controlled by the large formin family (Wasteneys and Yang, 2004).

Formins are characterized by the presence of two different formin homology domains, formin homology domain 1 (FH1) and formin homology domain 2 (FH2), that allow the multiple activities of these proteins on actin (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b; Kovar et al., 2003; Li and Higgs, 2003; Pring et al., 2003). In yeast, they are responsible for the formation of actin cables involved in both cell polarity and cytokinesis (Feierbach and Chang, 2001;

Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002a). Biophysical approaches show that for yeast and mammalian formins, the FH2 domain contains the actin binding site, whereas FH1 with its polyproline-rich stretches binds to profilin and the profilin/actin complex (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b; Li and Higgs, 2003). General features of all formins include the abilities to nucleate actin filaments, to interact with the barbed end of actin filaments, and to allow actin elongation at the barbed end while remaining attached to the same end (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b; Kovar et al., 2003; Li and Higgs, 2003; Higashida et al., 2004; Kovar and Pollard, 2004a; Romero et al., 2004). The latter behavior led to the elaboration of a model where formin acts as a processive actin-promoting factor (Pruyne et al., 2002; Zigmund et al., 2003). However, a detailed analysis of the literature on formins reveals a wide range of effects on actin polymerization (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b; Kovar et al., 2003; Li and Higgs, 2003; Zigmund et al., 2003; Harris et al., 2004; Romero et al., 2004). This is probably due to the multiple synergistic or antagonist reactions that formin has on actin polymerization (Kovar and Pollard, 2004b).

*Arabidopsis* has 21 FORMIN isoforms separated into two distinct phylogenetic subfamilies (Cvrcková, 2000; Deeks et al., 2002; Cvrcková et al., 2004). Class I is characterized by a predicted N-terminal transmembrane domain that partially targets the formin to or near the plasma membrane (Cheung and Wu, 2004; Favery et al., 2004; Van Damme et al., 2004; Ingouff et al., 2005). No data are yet available for class II. Overexpression of *Arabidopsis* FORMIN1 (AFH1) in pollen tubes induces the formation of prominent actin cables, pollen tube swelling, and deformation of the cell membrane at the tip of the pollen tube (Cheung and Wu, 2004). The complexity of formin activities makes predictions about the mechanisms underlying the broad effects seen on pollen tubes rather impractical. The yeast and mammalian cell biologists have expended considerable effort toward better understanding of the mechanisms of action of formin in vitro, whereas limited comparable data are yet available for plant formins (Ingouff et al., 2005). A detailed analysis of the mechanism of action of AFH1 is urgently needed before going any further in the understanding of its in vivo functions.

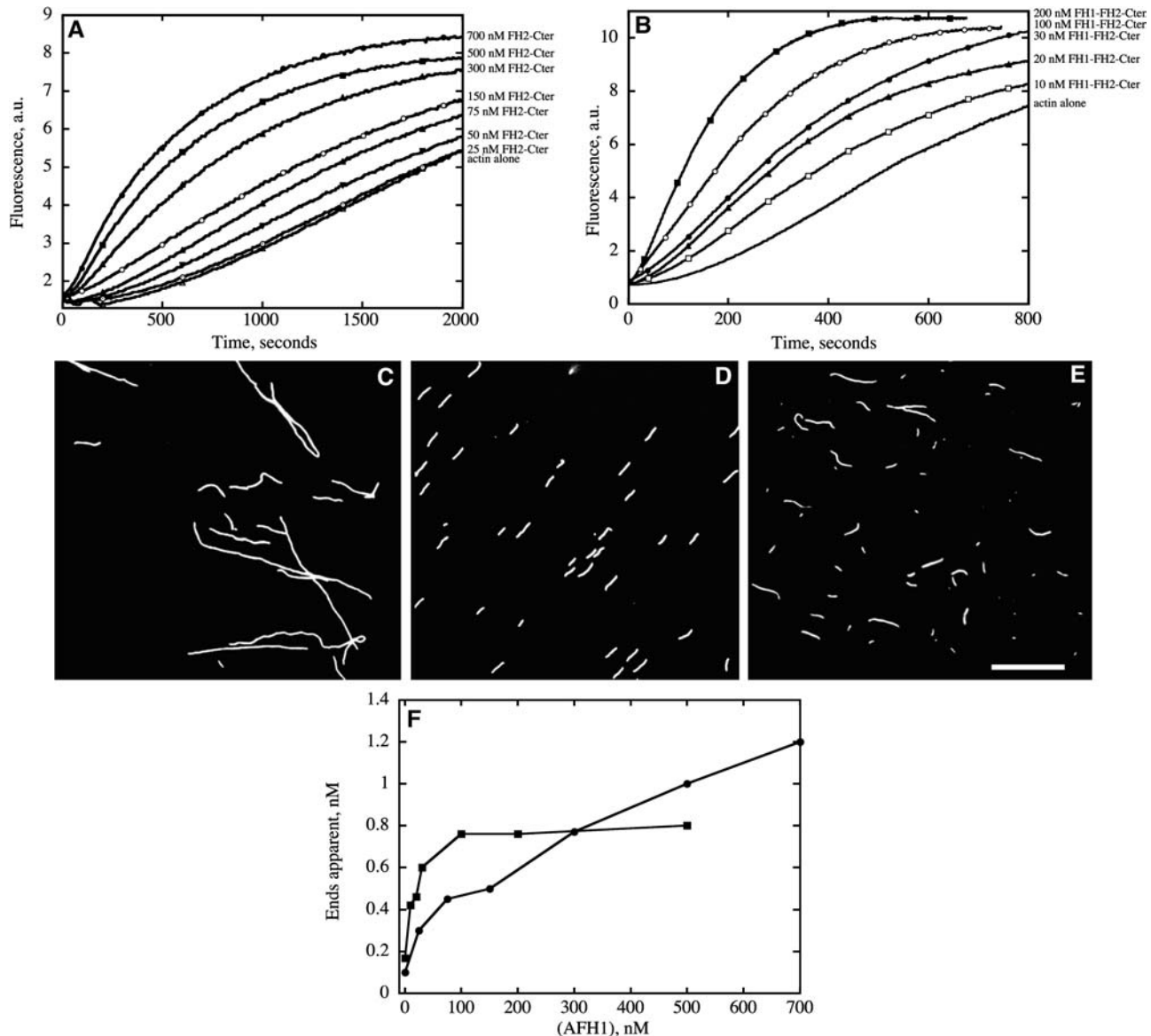
Here, we combined pyrene fluorescence and light scattering assays of actin polymerization, together with direct visualization

**Figure 1.** (continued).

- (A)** Schematic representation of the predicted domain organization of AFH1. The FH1 domain is dark gray (amino acids 430 to 567), and the FH2 domain is light gray (amino acids 588 to 999). Recombinant FH1-FH2-Cter and FH2-Cter fusion proteins include amino acids 430 to 1051 and 568 to 1051, respectively. SP, signal peptide; TM, transmembrane domain; aa, amino acids.
- (B)** Sequence alignment of AFH1 FH2-Cter domain with the equivalent domain of fission yeast Cdc12p and budding yeast Bni1p, based on the structure of FH2 domain of Bni1p (Xu et al., 2004). Multiple sequence alignment of the AFH1 domain with the *Saccharomyces cerevisiae* Bni1p FH2 domain and the *Schizosaccharomyces pombe* cytokinesis formin Cdc12p sequences was done with MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>). Superimposition with the secondary structures extracted from the Bni1p crystal structure (Protein Data Bank ID 1UX5) was done with EsPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>). Numbering is based on the Bni1p crystal structure (1UX5).
- (C)** Coomassie-stained 10.5% SDS-PAGE of purified recombinant formin proteins after purification by affinity chromatography on glutathione-Sepharose followed by nickel-Sepharose for GST-AFH1-His constructs or by nickel-Sepharose only for His-AFH1-His construct. Lane 1, molecular weight markers in kD; lane 2, GST-FH2-Cter-His protein; lane 3, GST-FH1-FH2-Cter-His protein; lane 4, His-FH1-FH2-Cter-His protein.
- (D)** Analytical gel filtration analysis of AFH1, FH1-FH2-Cter constructs. Peak elution volumes for the following markers are shown along the top: 85 Å = thyroglobulin; 61 Å = ferritin; 48.1 Å = aldolase; 35.5 Å = BSA; 30.5 Å = ovalbumin. AFH1 GST-FH1-FH2-Cter-His elutes at 8.15 mL (solid line), corresponding to a Stokes radius of 41.2 Å, and His-FH1-FH2-Cter-His elutes at 8.3 mL (dashed line), corresponding to an apparent Stokes radius of 39.7 Å. a.u., arbitrary absorbance units.

of actin filaments at steady state by fluorescence microscopy or during polymerization by evanescent wave microscopy, to analyze the effect of AFH1 on actin dynamics. We demonstrate that recombinant FH2-Cter and FH1-FH2-Cter (the isolated FH1 and FH2 domains) were both able to accelerate polymerization of actin alone; however, the FH1 domain was essential for effective

nucleation of actin monomers bound to profilin. This plant actin binding protein is able to use the pool of actin monomers bound to profilin for efficient nucleation. FH2-Cter and FH1-FH2-Cter domains of AFH1 interact with the barbed ends of actin filaments, inhibiting end-to-end annealing, but their effect on barbed-end dynamics is very different and unique when compared



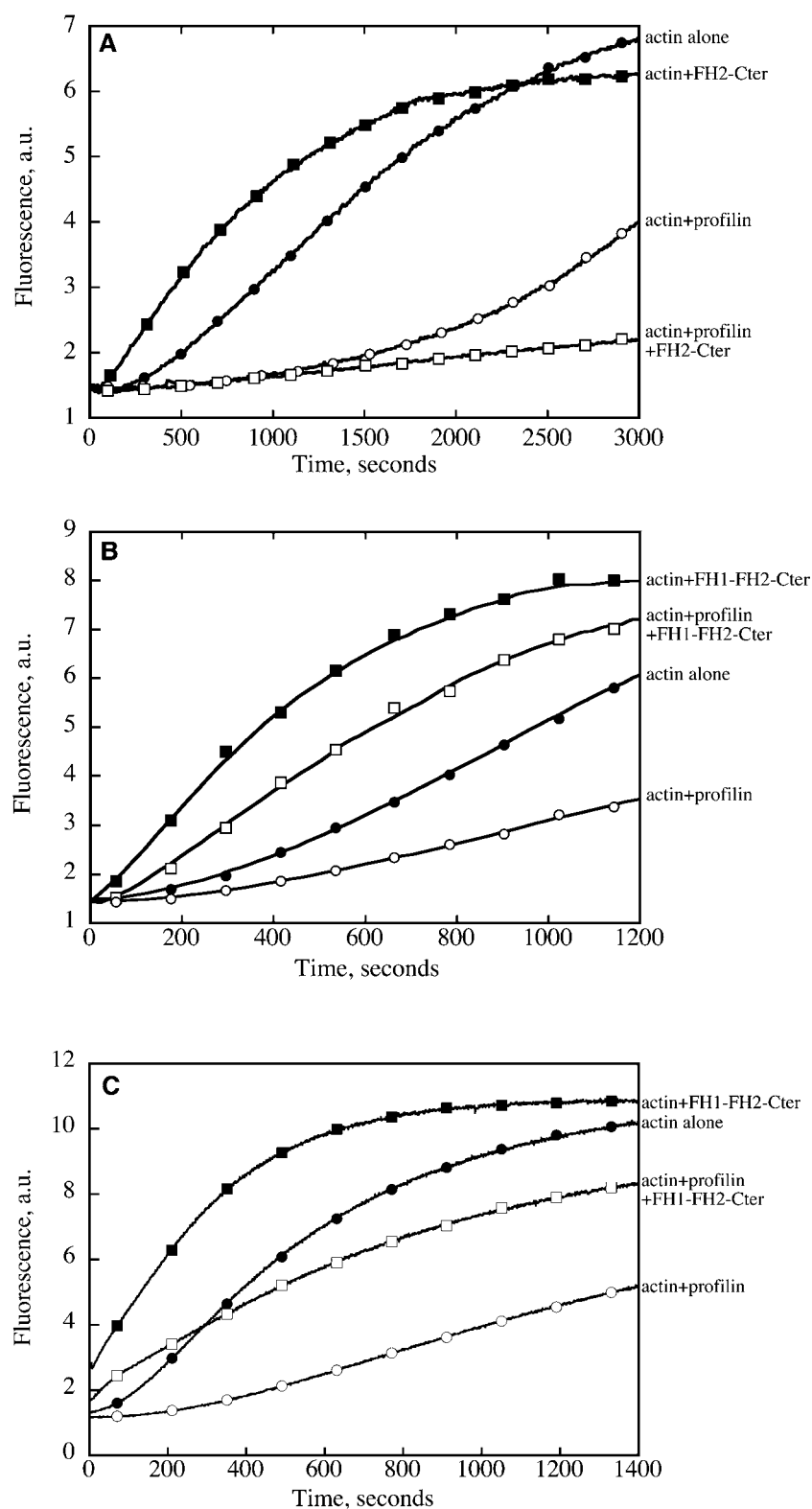
**Figure 2.** FH2-Cter and FH1-FH2-Cter Nucleate Actin Polymerization.

Conditions: 10 mM imidazole-HCl, pH 7.0, 50 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, 0.2 mM ATP, 0.2 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM DTT, and 3 mM  $NaN_3$  at 20°C. (A) Time course of actin polymerization in the presence of FH2-Cter monitored by pyrene fluorescence. Different concentrations of FH2-Cter were added to 2  $\mu$ M of 10% pyrene-labeled actin before initiation of polymerization.

(B) Time course of actin polymerization in the presence of FH1-FH2-Cter. Increasing amounts of FH1-FH2-Cter were added to 4  $\mu$ M of 10% pyrene-labeled actin before initiation of polymerization.

(C) to (E) Micrographs of actin filaments in the presence of AFH1. Actin alone (C), actin and 700 nM FH2-Cter (D), and actin and 200 nM FH1-FH2-Cter (E). Bar in (E) = 5  $\mu$ m.

(F) Nucleation efficiency of FH2-Cter and FH1-FH2-Cter. The efficiency of nucleation for FH2-Cter (closed circles) and FH1-FH2-Cter (closed squares) was determined at half-maximal polymerization according to Blanchoin et al. (2000b).



**Figure 3.** The FH1 Domain Is Necessary for Efficient Nucleation of Profilin/Actin Complex by AFH1.

Conditions: 10 mM imidazole, pH 7.0, 50 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, 0.2 mM ATP, 0.2 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM DTT, and 3 mM  $NaN_3$  at 20°C.

**(A)** Time course of actin polymerization in the presence of FH2-Cter and profilin monitored by pyrene fluorescence. Actin alone at 2  $\mu M$ , closed circles;

with nonplant formins. The FH2-Cter domain acts like an efficient capper and blocks elongation at the barbed end of actin filaments. However, the presence of the FH1 domain allows the FH1-FH2-Cter protein to bind the barbed ends and allow elongation at the barbed ends. More surprising, the FH1-FH2-Cter protein was able to bind to the side and bundle actin filaments directly. We report an actin nucleator that is able to organize actin filaments into unbranched actin filament bundles. These data strongly support a key role of AFH1 in the initiation and organization of actin cables from the pool of actin monomers bound to profilin.

## RESULTS

### Generation of Recombinant FH2-Cter and FH1-FH2-Cter Domains of AFH1

To characterize the mechanism of action of AFH1, we generated two C-terminal constructs containing the actin binding activity, FH2-Cter, and FH1-FH2-Cter, including amino acids 568 to 1051 and 430 to 1051, respectively (Figure 1A). A sequence comparison between FH2-Cter of yeast formins Bni1p, Cdc12p, and AFH1 reveals that AFH1 shares ~25% similarity with both proteins and has a Ser-rich extension of 46 amino acids at the C-terminal end (Figure 1B). The FH1 domain amino acids (430 to 567) contain a typical polyproline-rich stretch, implicated in binding to profilin (Evangelista et al., 1997; Watanabe et al., 1997; Banno and Chua, 2000), but shares low similarity with other formin FH1 domains. We expressed in bacteria both constructs of AFH1 with a glutathione S-transferase (GST) fusion at the N terminus and a 6-His tag at the C terminus (Figure 1C). Cleavage of GST from either construct induced a rapid degradation of the proteins. Because no differences in nucleation activity between GST-tagged and untagged proteins were detected, we used GST fusions for the bulk of our studies. To rule out the possibility of GST dimer formation, which might be responsible for the bundling activity observed with GST-FH1-FH2-Cter protein, we made recombinant FH1-FH2-Cter with a 6-His tag at both N and C termini (Figure 1C). Using analytical gel filtration, we compared the elution profiles of the two FH1-FH2-Cter proteins. Both proteins behaved similarly and eluted with an apparent Stokes radius at the peak of 41.2 and 39.7 Å, consistent with a spherical particle of 107 kD for GST-FH1-FH2-Cter-His and 96.7 kD for His-FH1-FH2-Cter-His. These values are slightly greater than the masses calculated for the monomers, 96.5 and 68.5 kD, respectively (Figure 1D). These proteins

eluted as a broad peak, suggesting that they exist probably in a monomer-dimer equilibrium.

### FH2-Cter and FH1-FH2-Cter Proteins Nucleate Actin Polymerization

We used a combination of pyrene-actin assays and direct visualization of actin filaments by light microscopy to study the effect of FH2-Cter and FH1-FH2-Cter on actin polymerization (Figures 2A to 2E). In pyrene fluorescence, both FH2-Cter and FH1-FH2-Cter proteins decreased the initial lag corresponding to the nucleation step for actin polymerization in a concentration-dependent manner (Figures 2A and 2B). The behavior of AFH1 FH2-Cter is distinct from the equivalent fusion protein AtFH5, which does not nucleate actin from a pool of free actin monomers (Ingouff et al., 2005). The amplitude of pyrene fluorescence at steady state, which is directly proportional to the actin filament concentration generated during polymerization, was only slightly affected by the presence of AFH1 FH1-FH2-Cter fusion protein. This suggests that this protein does not change the final polymer concentration during polymerization. Because the mean length of actin filaments is inversely proportional to the number of nuclei generated during the polymerization, we used light microscopy to determine directly the length of actin filaments generated at the end of actin polymerization in the presence of AFH1 fusion proteins. The presence of either protein in the polymerization mixture before dilution and observation in the light microscope showed a decrease in the mean size of actin filaments from 18 μm for actin alone to 3.4 and 3.7 μm for FH2-Cter (700 nM) and FH1-FH2-Cter (200 nM), respectively, in agreement with pyrene fluorescence polymerization curves (Figures 2C to 2E).

### The FH1 Domain Is Necessary for Actin Filament Nucleation from the Profilin/Actin Complex

It has been reported for some plant cells that a large pool of unpolymerized actin is buffered by a high concentration of profilin (Gibbon et al., 1999; Snowman et al., 2002; Staiger and Hussey, 2004). It was imperative to test whether or not AFH1 is able to use this large pool of actin bound to profilin for efficient nucleation of actin filaments. We first tested the effect of FH2-Cter on the polymerization of actin/profilin complex. The presence of an equimolar amount of profilin to actin inhibited the polymerization of actin by increasing the lag corresponding to the nucleation step (Figure 3A, open circles, compared with actin alone, closed circles). FH2-Cter was able to nucleate polymerization of actin alone (Figure 3A, closed squares). However,

**Figure 3.** (continued).

2 μM actin with 2 μM profilin, open circles; 2 μM actin with 300 nM FH2-Cter, closed squares; 2 μM actin with 2 μM profilin and 300 nM FH2-Cter, open squares.

**(B)** Time course of actin polymerization in the presence of FH1-FH2-Cter and profilin monitored by pyrene fluorescence. Actin alone at 2 μM, closed circles; 2 μM actin with 2 μM profilin, open circles; 2 μM actin with 50 nM FH1-FH2-Cter, closed squares; 2 μM actin with 2 μM profilin and 50 nM FH1-FH2-Cter, open squares.

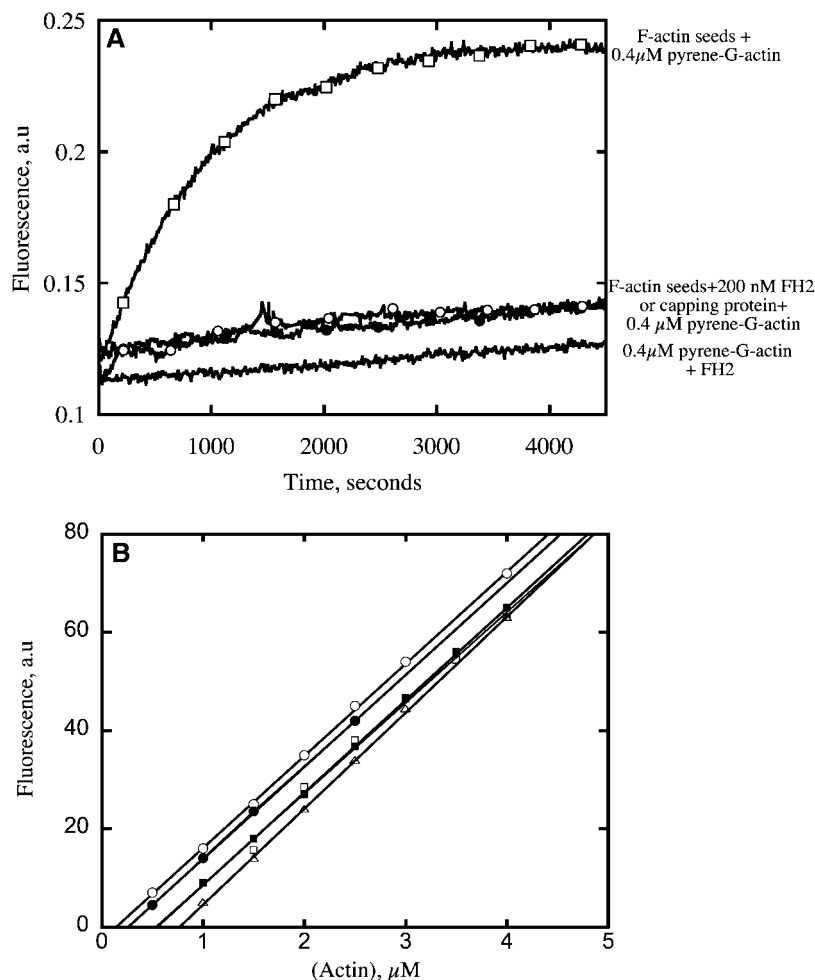
**(C)** Time course of maize actin polymerization in the presence of FH1-FH2-Cter and maize profilin (ZmPRO5) monitored by pyrene fluorescence. Actin alone at 2 μM, closed circles; 2 μM actin with 2 μM profilin, open circles; 2 μM actin with 100 nM FH1-FH2-Cter, closed squares; 2 μM actin with 2 μM profilin and 100 nM FH1-FH2-Cter, open squares.

polymerization was fully inhibited in the presence of both FH2-Cter and equimolar profilin to actin (Figure 3A, open squares). By contrast, FH1-FH2-Cter was able to nucleate actin alone (Figure 3B, closed squares) and profilin/actin complex (Figure 3B, open squares). Similar results were obtained when we replaced human profilin and muscle actin with maize profilin and pollen actin (Figure 3C). FH1-FH2-Cter was able to nucleate both pollen actin (Figure 3C, closed squares) and pollen actin bound to maize profilin (Figure 3C, open squares).

### FH2-Cter Blocks Elongation at the Barbed Ends Similar to Capping Protein

The profilin/actin complex can add only onto uncapped filament barbed ends (Pollard et al., 2000). A possible explanation for the

inhibition of actin polymerization in the presence of FH2-Cter and profilin/actin is that FH2-Cter blocks elongation at actin filament barbed ends (Xu et al., 2004; Otomo et al., 2005). To investigate this hypothesis, seeded filament elongation experiments were performed. These assays used actin filaments alone or in the presence of FH2-Cter, as seeds for elongation with a concentration of pyrene-labeled actin monomers that were below the critical concentration ( $C_c$ ) at the pointed ends (i.e.,  $0.7 \mu\text{M}$ ). Under these conditions, elongation occurs only at the barbed ends. The initial rate of elongation is then directly proportional to the concentration of free barbed ends. We found, as expected, that  $0.4 \mu\text{M}$  pyrene-actin monomers could elongate the F-actin seeds (Figure 4, open squares). By contrast, elongation of  $0.4 \mu\text{M}$  pyrene-labeled actin monomers was strongly inhibited in the presence of FH2-Cter (Figure 4, closed circles) similar to the

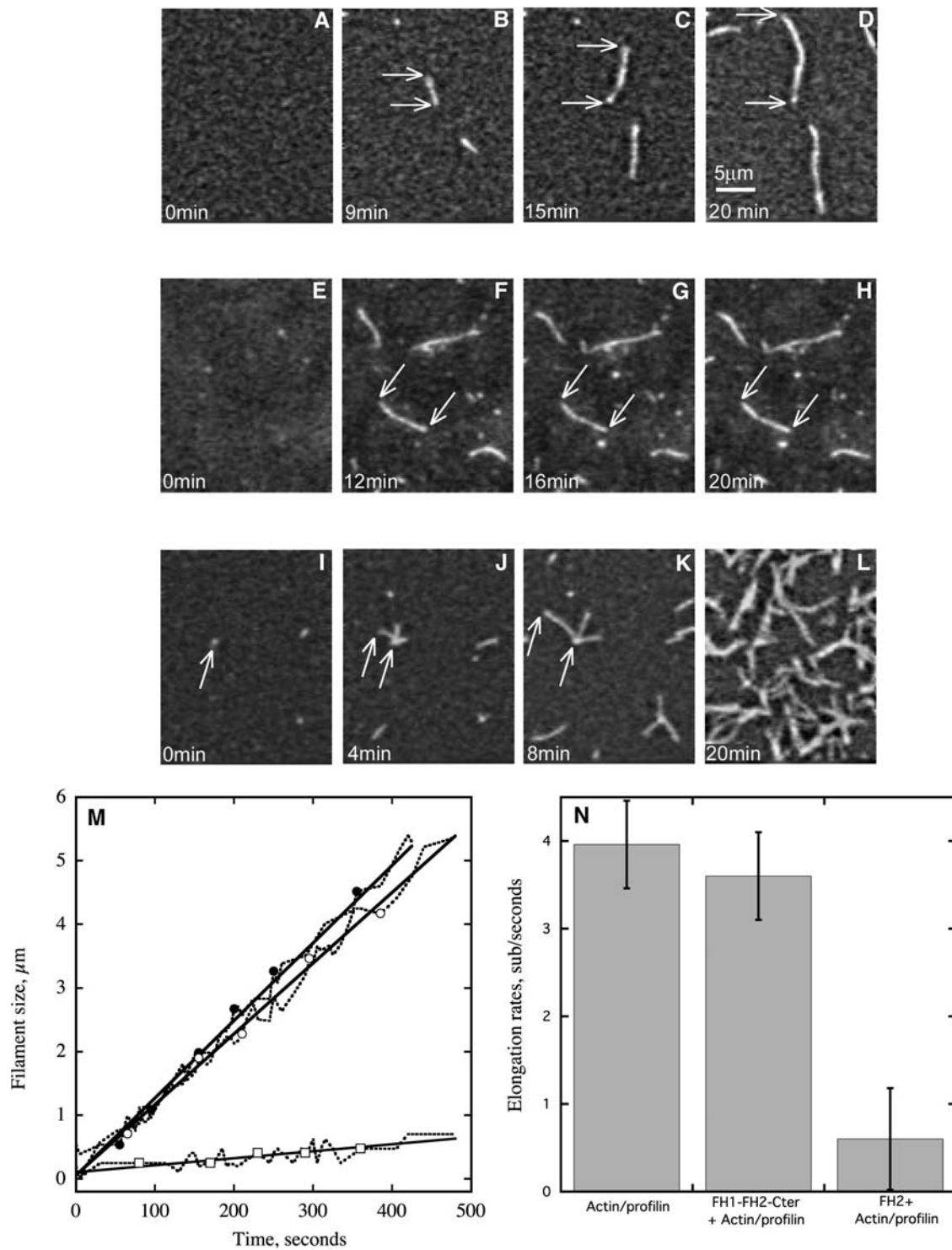


**Figure 4.** FH2-Cter Blocks Elongation at the Barbed Ends of Actin Filaments and Shifts the  $C_c$  to the Value for Pointed-End Assembly.

Conditions: 10 mM imidazole-HCl, pH 7.0, 50 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 0.2 mM ATP, 0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM DTT, and 3 mM  $\text{NaN}_3$  at  $20^\circ\text{C}$ .

**(A)** Time course of  $0.4 \mu\text{M}$  pyrene-labeled actin elongation from a reaction mixture of  $1 \mu\text{M}$  unlabeled actin filaments alone (open squares),  $1 \mu\text{M}$  unlabeled actin filaments preincubated with 200 nM FH2-Cter (closed circles), or  $1 \mu\text{M}$  unlabeled actin filaments preincubated with 200 nM capping protein (AtCP; open circles). Control for the effect of 200 nM FH2-Cter on the polymerization of  $0.4 \mu\text{M}$  pyrene-labeled actin (solid line).

**(B)** Effect of FH2-Cter and FH1-FH2-Cter proteins on the  $C_c$ . Dependence of actin polymer concentration on total actin concentration in the absence (open circles;  $C_c = 0.14 \mu\text{M}$ ) or presence of 200 nM FH1-FH2-Cter (closed circles;  $C_c = 0.24 \mu\text{M}$ ), 200 nM FH2-Cter (closed squares;  $C_c = 0.54 \mu\text{M}$ ), 200 nM AtCP (open squares;  $C_c = 0.59 \mu\text{M}$ ), or 200 nM human gelsolin (open triangles;  $C_c = 0.76 \mu\text{M}$ ).



**Figure 5.** Direct Visualization by TIRF Microscopy of the Effect of FH2-Cter or FH1-FH2-Cter on Actin Filament Elongation by Profilin/Actin Complex.

**(A) to (D)** Time lapse evanescent wave fluorescence microscopy of profilin/rhodamine-actin polymerization. Conditions: NEM-myosin was attached to the cover glass before addition into the flow cell of profilin/rhodamine-actin complex (2 and 1  $\mu\text{M}$ , respectively). Frames were taken at the indicated time during polymerization. Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

**(E) to (H)** Time lapse evanescent wave fluorescence microscopy of the effect of FH2-Cter on actin polymerization. Conditions: NEM-myosin and FH2-Cter (500 nM) were attached to the cover glass before addition into the flow cell of profilin/rhodamine-actin complex (2 and 1  $\mu\text{M}$ , respectively). Frames were taken at the indicated time during polymerization.

effect of Arabidopsis capping protein, a protein known to block barbed-end elongation (Huang et al., 2003) (Figure 4, open circles).

We next investigated the effect of both FH2-Cter and FH1-FH2-Cter proteins on the  $C_c$  for actin assembly. The FH2-Cter construct increased the  $C_c$  from 0.14  $\mu\text{M}$  for actin filament (Figure 4B, open circles) with free barbed ends to 0.54  $\mu\text{M}$ , a value close to that for the  $C_c$  of the pointed ends (Figure 4B, closed squares). Arabidopsis capping protein ( $C_c = 0.59 \mu\text{M}$ ; Figure 4, open squares) or human gelsolin ( $C_c = 0.76 \mu\text{M}$ ; Figure 4B, open triangles) had similar effects. However, the FH1-FH2-Cter construct has only a slight effect on the  $C_c$  ( $C_c = 0.24 \mu\text{M}$ ; Figure 4B, closed circles). These results suggest that the presence of the FH1 domain modulates the behavior of the FH2-Cter domain at the barbed end of actin filaments.

To further confirm this hypothesis, we used a total internal reflection fluorescence (TIRF) microscope assay designed by Kovar and Pollard (2004a). In this assay, both *N*-ethylmaleimide (NEM)-myosin and FH2-Cter or FH1-FH2-Cter were immobilized on the cover glass of a flow cell before addition of rhodamine-actin/profilin complex to monitor polymerization (Figure 5). NEM-myosin is necessary in this assay to maintain actin filaments in the focal plane of the evanescent wave of illumination. The design of the assay and use of the TIRF microscope allowed us to distinguish two types of events: first, the polymerization in the volume of the flow cell where no AFH1 is present; second, the polymerization at the cover glass where both NEM-myosin and AFH1 are present. We were mostly interested in the elongation events at the cover glass because these are more likely to have filaments with AFH1 bound at the barbed end. In the presence of FH2-Cter (500 nM), actin filaments that were attached to NEM-myosin and visible in the TIRF focal plane (100 to 150 nm from the glass) were able to elongate over a period of 20 min at a very slow rate of  $0.6 \pm 0.6$  subunits per second (see Supplemental Movie 2 online; Figures 5E to 5H, open squares in 5M, and 5N). However, in the absence of FH2-Cter (see Supplemental Movie 1 online; Figures 5A to 5D) or in the presence of FH1-FH2-Cter (see Supplemental Movie 3 online; Figures 5I to 5L), actin filaments at the cover glass were able to elongate several microns during the 20-min observation period. Only filaments attached by one end were measured to determine the rate of elongation in the presence of FH1-FH2-Cter construct to be sure that these filaments have a formin attached. The rates of elongation were  $4 \pm 0.5$  subunits per second for profilin/actin complex alone (Figures 5M, closed circles, and 5N) or  $3.5 \pm 0.5$  subunits per second for profilin/actin complex in the presence of FH1-FH2-Cter (Figures 5M, open circles, and 5N). This is in perfect agreement with the elongation and the  $C_c$  data (Figures 4A and

4B) and confirms that FH2-Cter blocks elongation at the barbed ends of actin filaments. According to these observations, we were then able to determine the nucleation efficiency of both constructs using the slope at half-maximal polymerization from the pyrene fluorescence curves (Figures 2A and 2B; Blanchoin et al., 2000b) using a rate constant of association  $10 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  for FH1-FH2-Cter (i.e., rate constant for barbed-end elongation) and  $1.3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  for FH2-Cter (i.e., rate constant for pointed end elongation) (Figure 2F). FH1-FH2-Cter generates a maximum of 0.026 filament barbed ends per formin molecule (Figure 2F). This is 10 times more efficient than the equivalent fusion protein for AtFH5, about the same efficiency as Bni1p, but 10 times less efficient than mDia1 or Cdc12p (Sagot et al., 2002b; Kovar et al., 2003; Li and Higgs, 2003; Ingouff et al., 2005).

### The Presence of the FH1 Domain Switches the FH2-Cter Protein from a Strong Capper to a Leaky Capper

Actin filament elongation assays (Blanchoin et al., 2000a) were used to determine the affinity of FH2-Cter and FH1-FH2-Cter for the barbed end of actin filaments (Figure 6). Freshly prepared seeds consisting of unlabeled actin filaments were incubated with various concentrations of FH2-Cter (Figure 6A) or FH1-FH2-Cter (data not shown) before addition of pyrene-labeled actin monomers. The decrease in the initial rate of elongation as a function of the concentration of AFH1 reflects the saturation of filament barbed ends by AFH1 fusion proteins (Figure 6B). Under these experimental conditions, the nucleation activity of both proteins at their highest concentrations did not contribute to the increase in the pyrene fluorescence signal (data not shown). We determined apparent  $K_d$  values of  $3.7 \pm 1.5$  nM for FH2-Cter (Figure 6B, closed circles) and  $40 \pm 12$  nM for FH1-FH2-Cter binding to muscle actin filament barbed ends (Figure 6B, open squares). The latter value is consistent with that measured for FH1-FH2-Cter from AtFH5 ( $K_d \sim 32$  nM; Ingouff et al., 2005). A  $K_d$  of  $3.1 \pm 0.4$  nM for FH2-Cter binding to pollen actin filament barbed ends (Figure 6B, open circles) confirmed that the source of actin does not affect AFH1 properties. Moreover, we found that binding of FH1-FH2-Cter to barbed ends decreased the rate of actin filament elongation, but unlike the FH2-Cter construct did not fully block elongation at the barbed ends (Figure 6B, open squares) in agreement with the  $C_c$  experiments (Figure 4B).

We reported previously that interaction of capping protein (CP) with the barbed end of actin filaments inhibits annealing of mechanically sheared actin filaments (Andrianantoandro et al., 2001; Huang et al., 2003). By wide-field fluorescence microscopy, we visualized the products of shearing a mixture of two colors of actin filaments directly (Figure 7). Ten seconds after

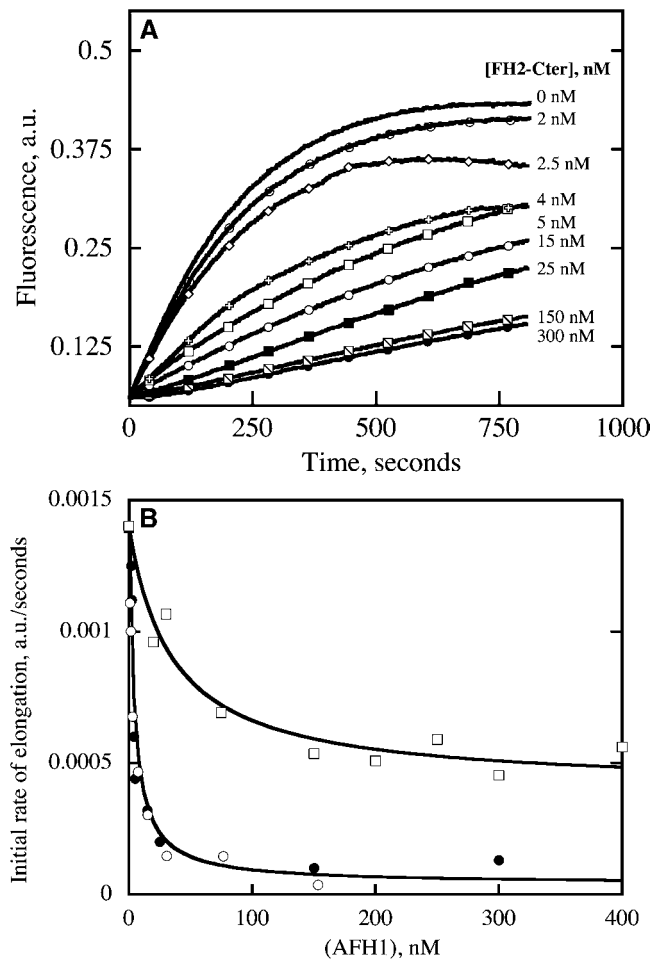
**Figure 5.** (continued).

**(I) to (L)** Time lapse evanescent wave fluorescence microscopy of the effect of FH1-FH2-Cter on actin polymerization. Conditions: NEM-myosin and FH1-FH2-Cter (200 nM) were attached to the cover glass before addition into the flow cell of profilin/rhodamine-actin complex (2 and 1  $\mu\text{M}$ , respectively). Frames were taken at the indicated time during polymerization. Arrows indicate the position of actin filament ends over time.

**(M)** Measurement of filament length changes over time. Dotted lines represent actin filament elongation for a single actin filament in the absence (closed circles) or presence of FH1-FH2-Cter (open circles) or FH2-Cter (open squares). Linear fits (solid line) allow determination of the elongation rate.

**(N)** Bar graphs comparing elongation rates of filaments in the absence or presence of FH1-FH2-Cter or FH2-Cter.





**Figure 6.** FH2-Cter Binds with a Higher Affinity to the Barbed Ends of Actin Filaments Than Does FH1-FH2-Cter.

**(A)** Kinetics of actin filament barbed-end elongation in the presence of FH2-Cter. Preformed actin filaments ( $1 \mu\text{M}$ ) were incubated with various concentrations of FH2-Cter before addition of  $1 \mu\text{M}$  pyrene-actin monomers.

**(B)** Variation in the initial rate of elongation as a function of FH2-Cter or FH1-FH2-Cter concentration. The data were fit with Equation 1 (see Methods) to determine equilibrium dissociation constant values of  $3.7 \text{ nM}$  for FH2-Cter (closed circles) with muscle actin,  $40 \text{ nM}$  for FH1-FH2-Cter (open squares) with muscle actin, and  $3.1 \text{ nM}$  for FH2-Cter (open circles) with pollen actin.

fragmentation, most of the filaments were very short (Figure 7A; mean length =  $1.5 \mu\text{m}$ ). Ten minutes after fragmentation, long actin filaments consisting of alternating red and green segments were formed by end-to-end annealing of the two original populations of filaments (Figures 7B and 7E; mean length =  $5.7 \mu\text{m}$ ). Incubation of actin filaments with  $100 \text{ nM}$  FH2-Cter before fragmentation inhibited the annealing reaction (Figures 7C and 7E; mean length =  $1.2 \mu\text{m}$ ). However, incubation with  $100 \text{ nM}$  FH1-FH2-Cter had only a slight effect on annealing (Figures 7D and 7E; mean length =  $4.1 \mu\text{m}$ ). Increasing the concentration of both FH2-Cter and FH1-FH2-Cter to  $500 \text{ nM}$  strongly inhibited

annealing (Figure 7E, mean length =  $0.5 \mu\text{m}$ ), demonstrating that both proteins interact with the barbed ends of actin filaments but with a different affinity.

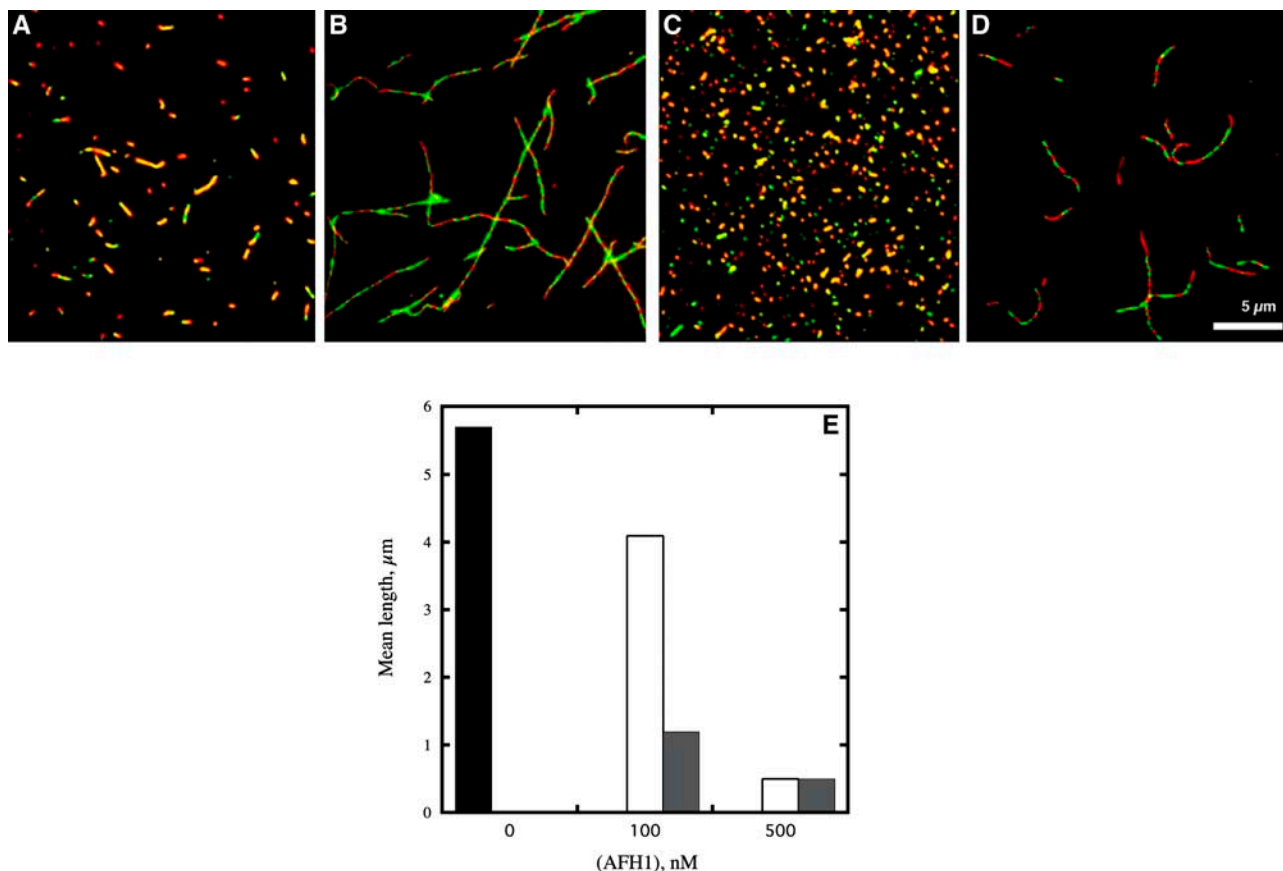
### CP and FH1-FH2-Cter Compete for Binding to the Barbed End of Actin Filaments

It has been reported recently that the heterodimeric Arabidopsis CP binds to the barbed end of actin filaments with high affinity ( $K_d \sim 12$  to  $24 \text{ nM}$ ) and blocks elongation with profilin/actin complex (Huang et al., 2003). We investigated how CP affects filament nucleation from profilin/actin complexes by FH1-FH2-Cter using the pyrene fluorescence assay (Figure 8). CP decreased the nucleation efficiency of FH1-FH2-Cter in a concentration-dependent manner (Figure 8). In the presence of equimolar CP and FH1-FH2-Cter protein, nucleation was completely inhibited (Figure 8, closed squares). This demonstrates that CP and FH1-FH2-Cter have antagonist effects at the barbed end of actin filaments.

### FH1-FH2-Cter Induces Bundling of Actin Filaments

During the fluorescence light microscopy assays, we discovered that FH1-FH2-Cter was able to organize individual actin filaments (Figure 9A) into long actin bundles (Figure 9C) similar to actin filament bundles observed in the presence of Arabidopsis VILLIN1, a well-characterized plant actin filament bundler (Figure 9B; Huang et al., 2005). No bundles were observed in absence of either VILLIN1 or FH1-FH2-Cter (Figure 9A). Bundling activity by a formin was originally reported for mouse formin FRL $\alpha$  (H. Rouiller, D. Hanein, and Harry Higgs, unpublished data). To further characterize the bundling activity of FH1-FH2-Cter, we performed a side by side low-speed cosedimentation assay with this protein and VILLIN1 (Figures 9D and 9E). At low speed, actin filaments and FH1-FH2-Cter alone were mostly recovered in the supernatant (Figure 9D, lanes 2 and 12). When mixed together, FH1-FH2-Cter induced the sedimentation of actin filaments in a concentration-dependent manner, consistent with bundle formation (Figure 9D, lanes 3 to 10). The bundling activity of FH1-FH2-Cter was independent of the presence of GST because the His-FH1-FH2-Cter-His fusion protein has a similar activity (Figure 9E, GST-FH1-FH2-Cter, open squares; His-FH1-FH2-Cter-His, closed squares) but depends strongly on the ionic strength (data not shown). AFH1 is a more efficient actin filament bundler than VILLIN1 (Figure 9E, closed circles; Huang et al., 2005). A possible explanation for the strong bundling activity of FH1-FH2-Cter comes from the strong affinity of FH1-FH2-Cter for the side of actin filaments ( $K_d \sim 0.13 \mu\text{M}$ ; Figure 9E, inset), which is eightfold higher than VILLIN1 ( $K_d \sim 1 \mu\text{M}$ ; Huang et al., 2005). In the same low-speed sedimentation assay, FH2-Cter has a weak actin bundling activity (Figure 9E, open circles), suggesting that the FH1 domain is essential for efficient bundle formation.

We used a light scattering assay to study the kinetics of bundle formation during actin polymerization (Huang et al., 2005; Figure 9F). Increasing the concentration of FH1-FH2-Cter induced a large increase in the amplitude of the polymerization curves, characteristic of bundle formation. For example, compare the



**Figure 7.** AFH1 Inhibits End-to-End Annealing of Actin Filaments.

Conditions: equal amounts of 2  $\mu\text{M}$  rhodamine-phalloidin labeled actin filaments and Alexa green-phalloidin labeled actin filaments were mixed and sheared by sonication and then allowed to anneal for 10 min before dilution.

(A) Fragmented filaments imaged immediately.

(B) Fragmented filaments imaged after 10 min.

(C) Fragmented filaments in the presence of 100 nM FH2-Cter imaged after 10 min.

(D) Fragmented filaments in the presence of 100 nM FH1-FH2-Cter imaged after 10 min. Bar = 5  $\mu\text{m}$ .

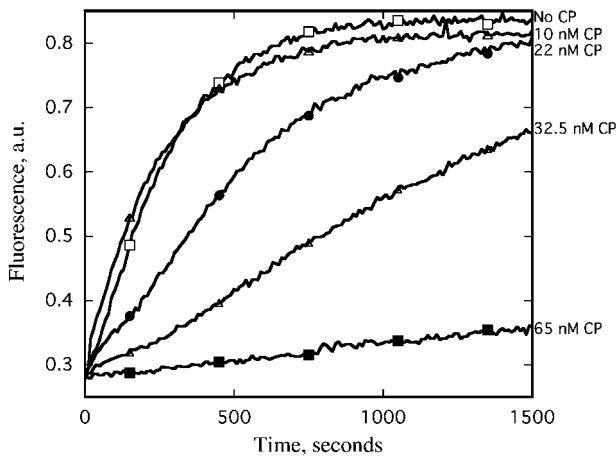
(E) Mean length distribution of fragmented filaments imaged at 10 min as a function of AFH1 concentrations. No AFH1, black bar; FH2-Cter, gray bars; FH1-FH2-Cter, white bars.

amplitude at 100 nM FH1-FH2-Cter (Figure 9F, closed circles) with the amplitude at 200 nM FH1-FH2-Cter (Figure 9F, open circles). The light scattering curves (Figure 9F) reached a plateau over a time frame comparable to the pyrene fluorescence curves (Figure 2B), suggesting that bundles form rapidly during polymerization. We also tested whether FH1-FH2-Cter was able to bundle preformed actin filaments (Figure 9G). Addition of FH1-FH2-Cter to actin filaments induced a rapid and large increase in light scattering, indicative of bundle formation (Figure 9E).

## DISCUSSION

Here, we study in detail the mechanism of action of AFH1. Arabidopsis FORMINs comprise a large family of 21 isoforms separated into two classes according to the presence or absence of a predicted N-terminal transmembrane domain

(Cvrcková, 2000; Deeks et al., 2002; Cvrcková et al., 2004). Formins are recently discovered actin nucleators responsible for actin cable formation in yeast (Evangelista et al., 1997; Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b). A general feature of nonplant formins is the presence of an actin nucleation domain (i.e., FH2 domain) and a polyproline-rich profilin binding domain (i.e., FH1 domain) (Evangelista et al., 2002). Arabidopsis class I formins seem to have retained this overall organization, whereas some divergence occurs in the class II FORMINs (Cvrcková, 2000; Deeks et al., 2002; Cvrcková et al., 2004). Although AFH1 is a member of Arabidopsis FORMIN class I, we found that it has a unique mode of action on actin polymerization. We show that a member of the formin family is able to generate actin bundles directly. Moreover, both the nucleating and the bundling activities of AFH1 depend on the Pro-rich FH1 domain that modulates the activity of the conserved FH2 nucleation domain. Indeed, the presence of FH1 domain converts the FH2 domain from a strong capper that



**Figure 8.** Arabidopsis CP Inhibits Nucleation by FH1-FH2-Cter.

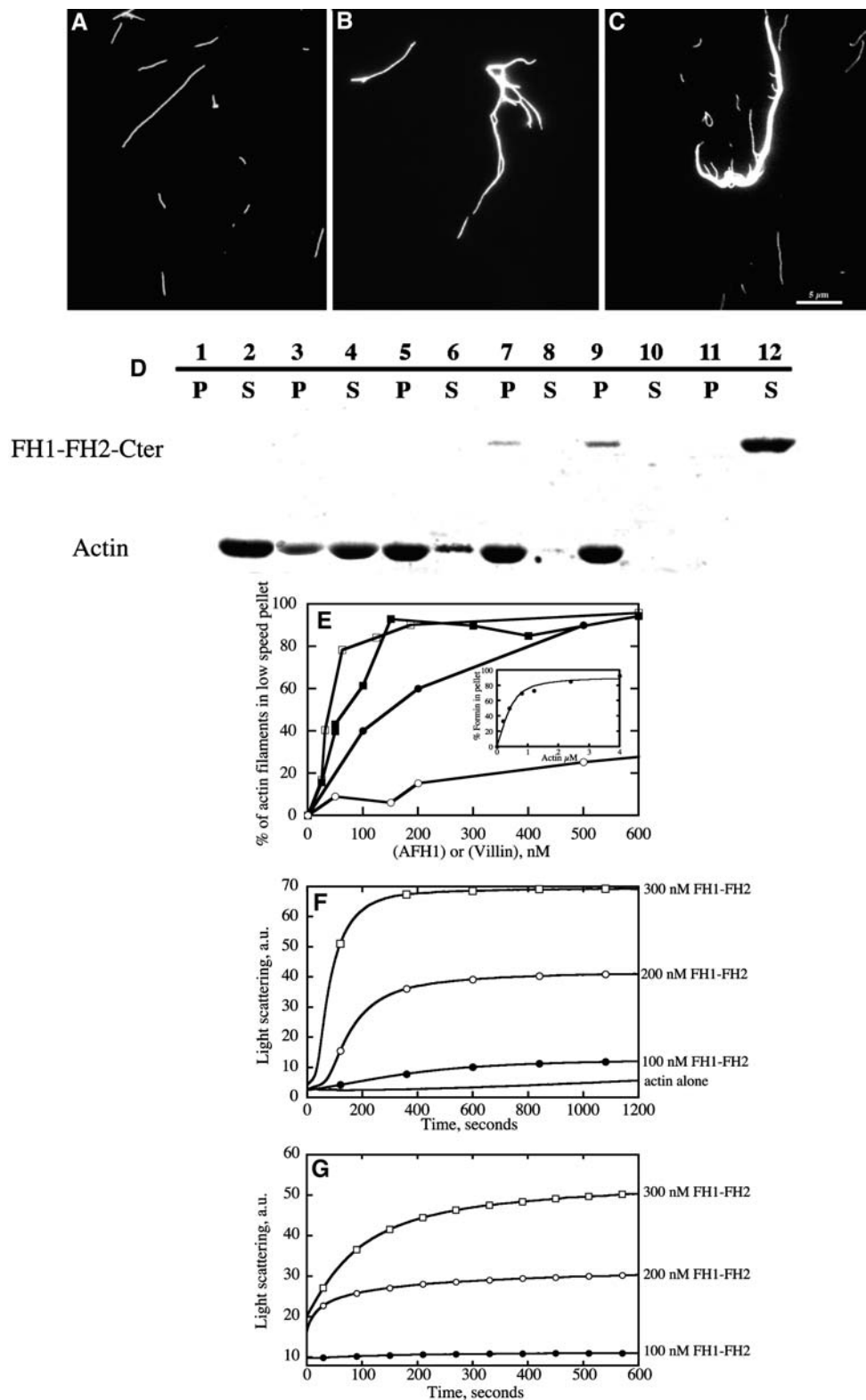
Conditions: 10 mM imidazole-HCl, pH 7.0, 50 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, 0.2 mM ATP, 0.2 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM DTT, and 3 mM  $NaN_3$  at 20°C. Actin (2  $\mu M$ ), profilin (2  $\mu M$ ), and FH1-FH2-Cter (65 nM) were incubated with various concentrations of CP before polymerization. The effect of increasing concentrations of Arabidopsis CP on actin polymerization in the presence of FH1-FH2-Cter and profilin monitored by pyrene fluorescence as a function of time is plotted.

blocks elongation at the barbed ends to a leaky cap that allows filament barbed-end growth. To decipher the contribution of proteins with multiple competing or synergistic effects on actin dynamics (including nucleation, capping, and bundling activities), we employed assays, including spectroscopy of pyrene fluorescence or light scattering, in parallel with fluorescence light microscopy by evanescent wave imaging of dynamic actin polymerization. The finding that AFH1 is not a simple actin nucleator but can generate actin bundles *in vitro* provides a potential explanation for the recent *in vivo* observation of actin cable formation induced by the overexpression of AFH1 in pollen tubes (Cheung and Wu, 2004).

Understanding how actin filaments are generated in plant cells remains an open question. The presence of high concentrations of profilin has been proposed to buffer the majority of free actin monomers (Gibbon et al., 1999; Staiger and Hussey, 2004). An important consequence of the high profilin concentration *in vivo* is the total inhibition of the spontaneous actin polymerization (Pollard et al., 2000). The *in vivo* polymerization of actin in a plant cell will therefore require regulation of the profilin-actin interaction or intervention of an actin nucleation factor. Analysis of the Arabidopsis genome reveals the presence of two universal homologs of actin nucleation-promoting factors, the Arp2/3 complex and FORMINs, although nucleating activity remains to be shown for the Arp2/3 complex (Cvrcková, 2000; Deeks et al., 2002; Deeks and Hussey, 2003; Cvrcková et al., 2004; Smith and Li, 2004; Wasteney and Yang, 2004). Recently, a recombinant FH1-FH2-Cter fusion protein from AtFH5 was shown to nucleate actin filaments, whereas the FH2-Cter had no such activity (Ingouff et al., 2005). Here, we show that AFH1, FH1-FH2-Cter and FH2-Cter fusion proteins reduced the initial lag phase of the actin polymerization curves, corresponding to the nucleation

step, in a concentration-dependent manner (Figures 2A and 2B). Fluorescence light microscopy provided further evidence of the nucleation efficiency for both AFH1 constructs. Indeed, the presence of AFH1 in the polymerization mixture reduced the length of actin filaments dramatically (Figures 2C to 2E). Because no severing activity for either AFH1 protein was detected, the decrease in actin filament length is best explained by an increase in the concentration of nuclei generated by AFH1, as reported previously for nucleation by the *Acanthamoeba* or mammalian Arp2/3 complex or other formins (Blanchoin et al., 2000b; Kovar et al., 2003). Both FH2-Cter and FH1-FH2-Cter constructs were able to nucleate actin alone, whereas the presence of the FH1 domain was essential for nucleation of the profilin/actin complex (Figure 3) and is in agreement with previous reports (Sagot et al., 2002b; Kovar et al., 2003; Pring et al., 2003; Romero et al., 2004). Moreover, FH2-Cter inhibits completely the polymerization of profilin/actin complex (Figure 3A) similar to other formins (Romero et al., 2004). Although similar data have been previously reported for other formins, additional data presented in this study suggest a mechanism of action for AFH1 that is different.

We find that both FH2-Cter and FH1-FH2-Cter bind to the barbed end of actin filaments, decrease the elongation rate of actin filaments, and inhibit end-to-end annealing of actin filaments. These properties, originally described for CPs (Andrianantoandro et al., 2001; Huang et al., 2003), have been extended to other proteins that interact with the barbed end of actin filaments, including formin and gelsolin (Kovar et al., 2003; Harris et al., 2004; Huang et al., 2004). The interaction of AFH1 with the barbed end of actin filaments is strongly dependent on the presence of the FH1 domain. We find that AFH1, FH2-Cter behaves similarly to Arabidopsis CP to block barbed-end elongation and allow nucleation of actin filaments that grow only from their pointed ends (Figures 3 to 7; Huang et al., 2003). Recently, the crystal structure of the yeast Bni1p FH2 domain in complex with tetramethylrhodamine-actin was solved (Otomo et al., 2005). This structure indicates that the barbed ends of actin filaments generated by FH2 are sterically blocked in agreement with our data (Otomo et al., 2005). However, Bni1p FH2 or FH1-FH2 domains nucleate filaments that elongate at their barbed ends (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b; Kovar and Pollard, 2004a; Moseley et al., 2004). A possible explanation for this discrepancy, proposed by Otomo et al. (2005), is that the FH2 is in equilibrium between two states allowing or not allowing barbed-end growth. Our data suggest that the AFH1, FH2-Cter domain, like fission yeast Cdc12p, exists mostly in the state that sterically blocks barbed-end elongation (this study; Kovar et al., 2003). In contrast with Cdc12p, we report that AFH1, FH1-FH2-Cter binds to the barbed ends but still allows elongation at the same ends, in agreement with the leaky capping property previously reported for Bni1p (Figures 5 and 6; Zigmund et al., 2003). We propose that the presence of the FH1 domain in AFH1 induces a conformational change in the FH2 domain and stabilizes an accessible configuration at the barbed ends, making elongation at that end possible. This is closely related to the mechanism of action of fission yeast Cdc12 (FH1-FH2)p; however, Cdc12 (FH1-FH2)p alone is not sufficient to generate filaments that grow in the barbed-end direction and requires the presence of profilin bound to the FH1 domain (Kovar et al., 2003).



**Figure 9.** FH1-FH2-Cter but Not FH2-Cter Induced the Formation of Actin Bundles.

**(A) to (C)** Direct visualization of actin filament bundles in the presence of AFH1 or VILLIN1.  
**(A)** Micrograph of actin filaments alone.

An attractive model for the behavior of AFH1 (FH1-FH2) can be extrapolated from the end-side binding model for mammalian formin proposed by Harris and Higgs (2004). In this model, the FH2 domain of formin binds to the side of actin subunits at the filament barbed ends (Harris and Higgs, 2004). In the case of AFH1, we propose that the FH2 domain alone binds mostly to the barbed ends of actin filaments, whereas the presence of the FH1 domain will induce a conformational change on AFH1 that allows a rapid equilibrium between the side binding and the end binding of the FH2-Cter domain, thereby allowing the switch from pointed-end to barbed-end elongation. This may explain why no actin filament buckling was observed between AFH1 (FH1-FH2) and myosin attachment points in the TIRF microscopy assay (Figures 5I to 5L), in contrast with findings with Cdc12p or Bni1p (Kovar and Pollard, 2004a). These data suggest that AFH1 (FH1-FH2) does not stay continuously bound to the growing barbed end. Obviously, this is not the only model possible. AFH1 (FH1-FH2) could also cycle rapidly on and off the barbed end of actin filaments to allow barbed-end growth. Based on the recent crystal structure of Bni1p FH2 bound to rhodamine actin (Otomo et al., 2005), we cannot predict the effect of the presence of the FH1 on the overall structure of formin bound to actin. The amino acid sequences of formin are divergent enough to allow major structural differences in their contacts with actin. Further structural information on the binding of AFH1 to actin will be required to fully understand the overall conformational change between FH2 and FH1-FH2 constructs.

The control of actin elongation at the barbed ends of actin filaments relies on tightly coordinated action of formin and CPs (Wear and Cooper, 2004). A conserved property of formin is to decrease the affinity of CP for the barbed end of actin filaments (Kovar et al., 2003; Zigmond et al., 2003; Harris et al., 2004; Moseley et al., 2004). Recently, Romero et al. (2004) demonstrated that the presence of formin (mDia1) lowers the affinity of CapG for the barbed ends by 100-fold. Interestingly, the binding of mDia1 and CapG to the barbed ends seems not to be directly competitive, but rather they form a complex that poisons actin elongation (Romero et al., 2004). We report that Arabidopsis CP, at a one-to-one molar ratio with FORMIN, inhibits actin polymerization induced by AFH1 (FH1-FH2) completely (Figure 8). This property, different from nonplant formins, favors a model whereby AFH1 (FH1-FH2) does not stay attached continuously at the barbed ends of actin filaments. So, the cellular concentrations

of CP and formin, and their respective affinities for barbed ends, are key elements to understand how these two proteins will exert control over actin elongation. The affinity of Arabidopsis CP for the barbed ends of actin filament ( $K_d \sim 12$  to 24 nM) is 6- to 100-fold lower than yeast or vertebrate CP (Huang et al., 2003). However, this affinity is only slightly affected by the presence of AFH1 (FH1-FH2) (data not shown). In plants, because of the lower affinity of CP for barbed ends, the inhibition by formin of barbed-end capping with CP may not be as relevant as in other organisms. Other cellular factors, including phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Huang et al., 2003) and phosphatidic acid (S. Huang, L.Y. Gao, L. Blanchoin, and C.J. Staiger, unpublished data), affect the activity of Arabidopsis CP and may play an important role in coordinating the dynamics at actin filament barbed ends in the presence of both formin and CPs.

An exciting novel feature of AFH1 (FH1-FH2) is the ability to bind the side of actin filaments and organize them into cable-like structures without a need for other cellular factors (Figure 9). We find that the FH1 domain is necessary for bundling by AFH1 (Figure 9). Bundling occurs during polymerization or on pre-formed actin filaments as revealed by a combination of fluorescence microscopy, low-speed sedimentation assays, and light scattering (Figure 9). This bundling activity is consistent with the end-side binding model because actin filament cross-linking requires an interaction with the side of actin filaments (this report; Harris and Higgs, 2004). Our data suggest that the capping, end binding site, and the bundling side binding site of AFH1 are tightly related. In the leaky capper state, the FH2 domain may bind to the barbed ends and to the side of actin filaments in a similar way. Indeed, the high affinity of FH1-FH2 for the side of actin filaments suggests that the majority of the cross-linking formin molecules will not be attached to the end of the filament (Figure 9). The bundling activity of AFH1 (FH1-FH2) is in good agreement with the effect of overexpression of AFH1 in pollen tubes (Cheung and Wu, 2004). Overexpression of AFH1 induces abundant actin cable formation and affects both the morphology and growth of the pollen tube (Cheung and Wu, 2004).

Actin cables have been reported to serve as tracks for vesicle delivery and are required for plasma membrane expansion and cell wall biogenesis (Shimmen and Yokota, 2004). This study emphasizes the potential role of formin in generation of actin-based structures *in vivo*. The localization of AFH1 depends on the putative N-terminal transmembrane domain, whereas its

**Figure 9.** (continued).

**(B)** Micrograph of actin filament bundles formed in the presence of 1  $\mu$ M VILLIN1.

**(C)** Micrograph of actin filament bundles in the presence of 800 nM FH1-FH2-Cter. Bar = 5  $\mu$ m.

**(D)** Bundling activity of FH1-FH2-Cter was determined by a low-speed cosedimentation assay. Lanes 1 and 2, actin filaments alone (2  $\mu$ M); lanes 3 and 4, actin filaments and FH1-FH2-Cter (25 nM); lanes 5 and 6, actin filaments and 65 nM FH1-FH2-Cter; lanes 7 and 8, actin filaments and 125 nM FH1-FH2-Cter; lanes 9 and 10, actin filaments and 180 nM FH1-FH2-Cter; lanes 11 and 12, AFH1 alone at 500 nM. P, pellet; S, supernatant.

**(E)** Percentage of actin filaments recovered in the low-speed pellet as a function of the concentration of FH2-Cter (open circles), FH1-FH2-Cter protein (open squares), His-FH1-FH2-Cter-His (closed squares), or VILLIN1 (closed circles). Inset shows the percentage of FH1-FH2-Cter construct in the pellet as a function of actin filament concentration. FH1-FH2-Cter binds to actin filaments with an apparent  $K_d$  of 0.13  $\mu$ M.

**(F)** Time course of actin polymerization monitored by light scattering. Actin alone, solid line; addition of FH1-FH2-Cter at 100 nM, closed circles; 200 nM, open circles; 300 nM, open squares.

**(G)** Time course of the increase in light scattering after addition of FH1-FH2-Cter to actin filaments. Actin filaments after addition of FH1-FH2-Cter at 100 nM closed circles; 200 nM, open circles; 300 nM, open squares.

activity lies in the FH1-FH2-Cter domains (Cheung and Wu, 2004; this study). However, AFH1 localization seems not restricted to the cell membrane (Cheung and Wu, 2004). Overexpression of the FH2 domain of AFH1 has a reduced activity with respect to the amount of actin cables present in the pollen tube (Cheung and Wu, 2004). Our study shows that AFH1, FH2-Cter and FH1-FH2-Cter domains have opposite effects on actin polymerization in the presence of profilin (Figure 3). FH1-FH2-Cter acts as a potent nucleator that rapidly generates new actin filaments from the profilin actin pool, whereas FH2-Cter acts as a strong actin filament barbed-end cap under the same conditions. Our data explain how the presence of profilin and the FH1 domain of AFH1 can modulate the function of this protein in agreement with the in vivo observations. Moreover, we have shown that FH1-FH2-Cter was able to generate actin bundles during polymerization or from preexisting filaments. Overexpression of FH1-FH2-Cter in pollen will reorganize all actin filaments into bundles independently of the nucleation activity. This activity is similar to other actin-bundling proteins, including plant fimbrin and villin (Kovar et al., 2000b; Huang et al., 2005; L.Y. Gao, D.W. McCurdy, and C.J. Staiger, unpublished data). Our data highlight the need for a careful characterization of the mechanism of action of actin binding proteins to further understand their in vivo functions. In a cellular context, we propose that AFH1 will initiate the formation of actin cable-like structures at the plasma membrane. The side binding and bundling activity of AFH1 could be important to initiate a cluster of actin cables in a very specific area. Obviously, depending on the context, these cables could be further stabilized by villin or other bundling proteins (Huang et al., 2005), or they could rapidly turnover by action of actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin or gelsolin family members (Carlier et al., 1997; Maciver and Hussey, 2002; Huang et al., 2004). Localization of AFH1 with isoform-specific antibodies will be needed to further address the link between AFH1 and actin filament distribution in vivo.

FORMIN is a large family of 21 isoforms in Arabidopsis, separated into two classes depending on the presence of a transmembrane domain at the N terminus (Deeks et al., 2002; Cvrcková et al., 2004). There is no doubt that significant differences in the mechanism of action together with cellular localization of these formins will correlate with specific functions. Recently, Arabidopsis FORMIN5, AtFH5, a conserved actin nucleator, has been shown to affect cytokinesis and morphogenesis in endosperm (Ingouff et al., 2005). Another class I FORMIN, AtFH6, has been shown to be upregulated during parasitic nematode infection, but the mechanism involved in this regulation is largely unknown (Favery et al., 2004). It is highly ambitious just from the sequence to predict how a protein with the complexity of a formin will impact actin polymerization. Indeed, all formins tested so far present divergent properties (Kovar and Pollard, 2004b). Structural information is limited to the FH2 domain from yeast and mammalian formins (Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004; Otomo et al., 2005) that are weakly conserved with plant formins, thereby preventing any solid prediction of the structure of the plant FH2 domain. The current view that the role of formin in vivo is to block barbed-end capping by CP and allow long actin cables to elongate is over simplified. We have shown that AFH1 is more than just a nucleator. Other cellular factors including ADF and villin, together with the bundling ac-

tivity of AFH1, will strongly affect actin cable formation (Huang et al., 2005). Further work is needed to reveal if the bundling activity is a general feature of Arabidopsis FORMINs. Moreover, the amino acid sequence of AFH1 does not reveal any obvious mode for regulation of its activity. The degree of complexity of formin both as a multifunctional protein and as a large gene family will require concerted effort by the plant cytoskeleton community to understand their broad function. In any case, the fact that Arabidopsis plants defective for the Arp2/3 complex (the other conserved actin nucleator) have only minor phenotypes argues in favor of key functions played by FORMIN family proteins in plants.

## METHODS

### Protein Production

Two *AFH1* (At3g25500) fragments, FH1-FH2-Cter and FH2-Cter, were amplified by PCR from a RAFL clone containing *AFH1* cDNA (pda07914, RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan) using *NotI*-6HisR, containing a 6-His tag (5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTAATGGTATGGTATGGTGGTAAAGAACTAATGAGATTGAGTTATGTTCTGCTTCATC-3') with *Sall*-FH1 (5'-ACGCGTCGACGTCGGCAAGGTTTGAATCTCAGTTA-3') or *Sall*-FH2 (5'-ACGCGTCGACGGTCTGAAAACCTACCACTGACTTCG-3') primers. Error-free *Sall*-*NotI* PCR fragments were ligated to pGEX-4T1 vector (Amersham, Buckinghamshire, UK) restricted with *Sall*-*NotI*. The fragment corresponding to the FH1-FH2-Cter construct was also inserted into pET30a vector (Novagen, Madison, WI) restricted with *Sall*-*NotI*. These constructs were overexpressed in Rosetta Blue (DE3) pLysS strain of *Escherichia coli* (Novagen). Cells were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.8 at 37°C and induced with 0.5 mM isopropylthio-β-galactoside at 22°C overnight. Cultures were resuspended in extraction buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM sodium chloride, 5% glycerol, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT) with protease inhibitor cocktail. After sonication and centrifugation (23,000g, 30 min), the supernatant was incubated with glutathione-Sepharose 4B resin (Amersham), washed with TBSE (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT), and eluted with 100 mM glutathione in TBSE. Eluted fractions were dialyzed overnight against His purification buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM potassium chloride, 5 mM imidazole, and 2 mM 2-mercaptoethanol). The dialyzed proteins were incubated for 1 h with Talon resin (Clontech, Palo Alto, CA), washed with buffer 2 (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM potassium chloride, 20 mM imidazole, and 2 mM 2-mercaptoethanol), and eluted with elution buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM potassium chloride, 600 mM imidazole, and 2 mM 2-mercaptoethanol). After overnight dialysis against 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 1 mM sodium azide, proteins were concentrated with Centrprep YM-30 (Amicon, Bedford, MA) and flash frozen in liquid nitrogen. The His-FH1-FH2-Cter-His construct was purified using the same protocol without the glutathione-Sepharose step and dialyzed overnight in 25 mM imidazole, pH 8.0, 150 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 1 mM sodium azide.

Actin was isolated from rabbit skeletal muscle acetone powder (Spudich and Watt, 1971). Monomeric Ca-ATP-actin was purified by gel filtration chromatography on Sephacryl S-300 (MacLean-Fletcher and Pollard, 1980) at 4°C in G buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM DTT). Actin was labeled on Cys-374 to a stoichiometry of 0.8 to 1.0 with pyrene iodoacetamide (Kouyama and Mihashi, 1981); as modified by Pollard (1984). Mg-ATP-actin was prepared by incubation of Ca-ATP-actin on ice with 0.2 mM EGTA and an 11-fold molar excess of MgCl<sub>2</sub> over actin and used within 1 h. Actin was polymerized by addition of one-tenth volume (v/v) of 10× KMEI (500 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, and 100 mM imidazole-HCl, pH 7.0).

Maize (*Zea mays*) pollen actin was purified according to Ren et al. (1997). *Arabidopsis thaliana* CP, human profilin 1, and maize PROFILIN5 (ZmPRO5) were purified as described previously (Fedorov et al., 1994; Carlier et al., 1997; Kovar et al., 2000a; Huang et al., 2003). If not stipulated, all experiments were performed with skeletal muscle actin and human profilin 1.

### Actin Nucleation Assay

Actin nucleation was performed essentially as described by Higgs et al. (1999). Mg-ATP-monomeric actin or actin-profilin complexes (10% pyrene labeled) were polymerized at room temperature in the presence or absence of AFH1 by the addition of one-tenth volume of 10× KMEI. The polymerization was followed by changes in pyrene fluorescence using a MOS450 Bio-Logic fluorimeter (Bio-Logic-Science Instruments, Claix, France) or a Xenius SAFAS (Safas, Monaco).

### Elongation Assay to Determine the Affinity of FH2-Cter and FH1-FH2-Cter for the Barbed End of Actin Filament

Equivalent amounts of actin filaments were incubated for a few minutes at room temperature with various concentrations of AFH1. Elongation was initiated by the addition of pyrene-labeled actin monomers or pyrene-labeled actin monomers bound to profilin to the actin filament mixture. The affinity of the fusion proteins for the barbed end of actin filaments was determined by the variation of the initial rate of elongation as a function of the concentration of AFH1 using Equation 1:

$$V_i = V_{if} + (V_{ib} - V_{if}) \left( \frac{K_d + [\text{ends}] + [\text{AFH1}] - \sqrt{(K_d + [\text{ends}] + [\text{AFH1}])^2 - 4[\text{ends}][\text{AFH1}]}}{2[\text{ends}]} \right), \quad (1)$$

where  $V_i$  is the observed rate of elongation,  $V_{if}$  is the rate of elongation when all the barbed ends are free,  $V_{ib}$  is the rate of elongation when all the barbed ends are capped,  $[\text{ends}]$  is the concentration of barbed ends, and  $[\text{AFH1}]$  is the concentration of AFH1. The data were modeled by Kaleidagraph version 3.6 software (Synergy Software, Reading, PA).

### Fluorescence Microscopy

Actin filaments labeled with fluorescent phalloidin were observed in vitro by epifluorescence illumination as previously reported (Blanchoin et al., 2000b). Actin alone, or together with AFH1, was polymerized at room temperature in 1× KMEI and labeled with an equimolar amount of rhodamine-phalloidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) during polymerization. The polymerized F-actin was diluted to 10 nM in fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl, pH 7.0, 50 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM DTT, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  glucose oxidase, 15 mg/mL glucose, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  catalase, and 0.5% methylcellulose. A dilute sample of 3  $\mu\text{L}$  was applied to a  $22 \times 22$ -mm cover slip coated with poly-L-Lys (0.01%). Actin filaments were observed by epifluorescence illumination with a Zeiss Axioplan microscope (Jena, Germany) equipped with a 63×, 1.4–numerical aperture Planapo objective, and digital images were collected with a Hamamatsu ORCA CCD camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) using Axiovision software.

### Dual Color Annealing Assay

Actin filaments (2  $\mu\text{M}$ ) labeled with fluorescent rhodamine-phalloidin and 2  $\mu\text{M}$  of actin filaments labeled with fluorescent Alexa-488-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) were mixed together in the presence or absence of AFH1. The filaments were sheared by a quick sonication and allowed to anneal for 10 min before dilution into fluorescence buffer. Actin

filaments were observed by epifluorescence illumination as described above.

### TIRF Microscopy

We used methods recently described by Kovar and Pollard (2004a). Actin filaments were observed by TIRF illumination on an Olympus IX-71 inverted microscope equipped with a 60×, 1.45–numerical aperture Planapo objective (Melville, NY). The time course of actin polymerization was acquired at 5-s intervals with a Hamamatsu ORCA-EM-CCD camera (model C9100-12) using WASABI Imaging Software (version 1.4; Hamamatsu Photonics, Herrsching, Germany). Glass flow cells (Amann and Pollard, 2001) were coated with a mixture of 10 nM NEM-myosin alone or with FH2-Cter (500 nM) or FH1FH2-Cter (200 nM) for 1 min and washed with 1% BSA in fluorescence buffer. A mixture of 1  $\mu\text{M}$  Mg-ATP rhodamine-actin monomers 40% labeled (Cytoskeleton, Denver, CO) bound to 2  $\mu\text{M}$  of ZmPRO5 in fluorescence buffer was injected into the flow cells, and image acquisition began as soon as possible (typically 20 s after injection) for a 20-min period.

Elongation rates were determined by measuring filament lengths during actin filaments elongation with MetaMorph version 6.2r6 (Universal Imaging, Media, PA). Linear fits were made to the plots of length versus time, with the slope representing elongation rates. Rates were converted from  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  to subunits $\cdot\text{s}^{-1}$  using 333 actin monomers per micrometer.

### Cc Determination

A range of concentrations of 5% pyrene-labeled Mg-ATP-actin was polymerized in 1× KMEI in the absence or presence of FH2-Cter (200 nM), FH1FH2-Cter (200 nM), AtCP (200 nM), or gelsolin (200 nM) for 17 h in the dark at room temperature. Fluorescence measurements were performed at room temperature using a Safas Xenius fluorimeter. Linear best fit of the data, plotted as arbitrary fluorescence units versus actin concentration, was used to determine the intercept with x axis.

### Low- and High-Speed Cosedimentation Assays

Low-speed cosedimentation assays were used to examine the actin-bundling properties of FH2-Cter and FH1-FH2-Cter as previously reported for Arabidopsis FIMBRIN1 and VILLIN1 (Kovar et al., 2000b; Huang et al., 2005). All proteins were preclarified at 200,000g before each experiment. Various concentrations of FH2-Cter or FH1-FH2-Cter and actin filaments were incubated together and then centrifuged at 13,500g for 30 min at 4°C. Supernatants and pellets were collected and proteins were separated by SDS-PAGE. Coomassie Brilliant Blue–stained gels were digitized with a CanoScanLide 30 (Canon, Courbevoie, France), and the density of gel bands was quantified in the supernatant and pellet using NIH image.

High-speed cosedimentation assay was performed identically to the low-speed assay except that the proteins were centrifuged at 300,000g for 30 min at 20°C before separation of the supernatant and pellet.

### Light Scattering Assay to Characterize Filament Bundling Activity

A kinetic light scattering assay was performed to determine the ability of FH1-FH2-Cter to form actin bundles. Light scattering was monitored by 90° light scattering of unlabeled actin at 400 nm. The change of light scattering was recorded after addition of various concentrations of AFH1 into 2  $\mu\text{M}$  F-actin solution with a Safas Xenius fluorimeter.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lisa Gao and Faisal Chaudhry for providing purified pollen actin and plant profilin, François Parcy for advice on the cloning of AFH1

with a 6-His tag, and Robert Robinson and Rajaa Paterski-Boujemaa for critical reading of the manuscript. We are grateful to Harry Higgs for sharing unpublished data. This work was funded through grants from the Actions Thématiques et Initiatives sur Programmes et Equipes to L.B. and from the National Research Initiative of the USDA Cooperative State Research, Education, and Extension Service (Grant 2002-35304-12412 to C.J.S.). The TIRF microscope facility was supported by a grant from the Bindley Bioscience Center at Purdue University.

Received January 15, 2005; revised May 16, 2005; accepted May 19, 2005; published July 1, 2005.

## REFERENCES

- Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15009–15013.
- Andrianantoandro, E., Blanchoin, L., Sept, D., McCammon, J.A., and Pollard, T.D. (2001). Kinetic mechanism of end-to-end annealing of actin filaments. *J. Mol. Biol.* **312**, 721–730.
- Banno, H., and Chua, N.H. (2000). Characterization of the *Arabidopsis* formin-like protein AFH1 and its interacting protein. *Plant Cell Physiol.* **41**, 617–626.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000b). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007–1011.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000a). Interaction of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* **10**, 1273–1282.
- Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1307–1322.
- Chen, C.Y., Wong, E.I., Vidali, L., Estavillo, A., Hepler, P.K., Wu, H.M., and Cheung, A.Y. (2002). The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* **14**, 2175–2190.
- Cheung, A.Y., and Wu, H.M. (2004). Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell* **16**, 257–269.
- Cvrcková, F. (2000). Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biol.* **1**, 1–7.
- Cvrcková, F., Novotny, M., Pickova, D., and Zársky, V. (2004). Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *BMC Genomics* **5**, 1–18.
- Deeks, M.J., and Hussey, P.J. (2003). Arp2/3 and 'the shape of things to come'. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 561–567.
- Deeks, M.J., Hussey, P.J., and Davies, B. (2002). Formins: Intermediates in signal-transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization. *Trends Plant Sci.* **7**, 492–498.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M., Chow, C., Adames, N., Pringle, J., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**, 118–122.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* **4**, 32–41.
- Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., De Almeida-Engler, J., Lecomte, P., Vauzy, C., Arkowitz, R.A., and Abad, P. (2004). *Arabidopsis* formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell* **16**, 2529–2540.
- Fedorov, A.A., Pollard, T.D., and Almo, S.C. (1994). Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **241**, 480–482.
- Feierbach, B., and Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol.* **11**, 1656–1665.
- Gibbon, B.C., Kovar, D.R., and Staiger, C.J. (1999). Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* **11**, 2349–2363.
- Gibbon, B.C., Ren, H., and Staiger, C.J. (1997). Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function in vitro and in live cells. *Biochem. J.* **327**, 909–915.
- Harris, E.S., and Higgs, H.N. (2004). Actin cytoskeleton: Formins lead the way. *Curr. Biol.* **14**, R520–R522.
- Harris, E.S., Li, F., and Higgs, H.N. (2004). The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 20076–20087.
- Hepler, P.K., Vidali, L., and Cheung, A.Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 159–187.
- Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2004). Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* **303**, 2007–2010.
- Higgs, H.N., Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Influence of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) C terminus and Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* **38**, 15212–15222.
- Holdaway-Clarke, T.L., and Hepler, P.K. (2003). Control of pollen tube growth. *New Phytol.* **159**, 539–563.
- Huang, S., Blanchoin, L., Chaudhry, F., Franklin-Tong, V.E., and Staiger, C.J. (2004). A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 23364–23375.
- Huang, S., Blanchoin, L., Kovar, D.R., and Staiger, C.J. (2003). *Arabidopsis* capping protein (AtCP) is a heterodimer that regulates assembly at the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **278**, 44832–44842.
- Huang, S., Robinson, R.C., Gao, L.Y., Matsumoto, T., Brunet, A., Blanchoin, L., and Staiger, C.J. (2005). *Arabidopsis* VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *Plant Cell* **17**, 486–501.
- Ingouff, M., Fitz Gerald, J.N., Guérin, C., Robert, H., Sørensen, M.B., Van Damme, D., Geelen, D., Blanchoin, L., and Berger, F. (2005). Plant formin AtFH5 is an evolutionarily conserved actin nucleator in cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* **7**, 374–380.
- Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl) iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33–38.
- Kovar, D.R., Drobak, B.K., and Staiger, C.J. (2000a). Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell* **12**, 583–598.
- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L., and Pollard, T.D. (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J. Cell Biol.* **161**, 875–887.
- Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004a). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14725–14730.
- Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004b). Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1158–1159.



- Kovar, D.R., Staiger, C.J., Weaver, E.A., and McCurdy, D.W. (2000b). AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **24**, 625–636.
- Le, J., El-Assal Sel, D., Basu, D., Saad, M.E., and Szymanski, D.B. (2003). Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. *Curr. Biol.* **13**, 1341–1347.
- Li, F., and Higgs, H.N. (2003). The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr. Biol.* **13**, 1335–1340.
- Li, Z., Kim, E.S., and Bearer, E.L. (2002). Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change. *Blood* **99**, 4466–4474.
- Lin, Y., and Yang, Z. (1997). Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth. *Plant Cell* **9**, 1647–1659.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin agarose. *J. Cell Biol.* **127**, 107–115.
- Maciver, S.K., and Hussey, P.J. (2002). The ADF/cofilin family: Actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* **3**.
- MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* **20**, 329–341.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., and Hulskamp, M. (2003a). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1632–1645.
- Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Srinivas, B.P., and Hulskamp, M. (2003b). Arabidopsis *CROOKED* encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* **130**, 3137–3146.
- Moseley, J.B., Sagot, I., Manning, A.L., Xu, Y., Eck, M.J., Pellman, D., and Goode, B.L. (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol. Biol. Cell* **15**, 896–907.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488–494.
- Pollard, T.D. (1984). Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* **99**, 769–777.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 545–576.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., and Zigmond, S.H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* **42**, 486–496.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: Nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612–615.
- Ren, H., Gibbon, B.C., Ashworth, S.L., Sherman, D.M., Yuan, M., and Staiger, C.J. (1997). Actin purified from maize pollen functions in living plant cells. *Plant Cell* **9**, 1445–1457.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419–429.
- Sagot, I., Klee, S.K., and Pellman, D. (2002a). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* **4**, 42–50.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D. (2002b). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* **4**, 626–631.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A., and Wittinghofer, A. (2004). The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol. Cell* **13**, 511–522.
- Shimmen, T., and Yokota, E. (2004). Cytoplasmic streaming in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 68–72.
- Smith, L.G., and Li, R. (2004). Actin polymerization: Riding the wave. *Curr. Biol.* **14**, R109–R111.
- Snowman, B.N., Kovar, D.R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V.E., and Staiger, C.J. (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell* **14**, 2613–2626.
- Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866–4871.
- Staiger, C.J. (2000). Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **51**, 257–288.
- Staiger, C.J., and Hussey, P.J. (2004). Actin and actin-modulating proteins. In *The Plant Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*, P.J. Hussey, ed (Oxford: Blackwell Publishers), pp. 32–80.
- Staiger, C.J., Yuan, M., Valenta, R., Shaw, P.J., Warn, R.M., and Lloyd, C.W. (1994). Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr. Biol.* **4**, 215–219.
- Szymanski, D.B., Marks, M.D., and Wick, S.M. (1999). Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 2331–2347.
- Van Damme, D., Bouget, F.Y., Van Poucke, K., Inze, D., and Geelen, D. (2004). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: A survey of GFP-tagged proteins. *Plant J.* **40**, 386–398.
- Vantard, M., and Blanchoin, L. (2002). Actin polymerization processes in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 502–506.
- Vidali, L., McKenna, S.T., and Hepler, P.K. (2001). Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2534–2545.
- Wasteneys, G.O., and Galway, M.E. (2003). Remodeling the cytoskeleton for growth and form: An overview with some new views. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 691–722.
- Wasteneys, G.O., and Yang, Z. (2004). New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiol.* **136**, 3884–3891.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16**, 3044–3056.
- Wear, M.A., and Cooper, J.A. (2004). Capping protein: New insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 418–428.
- Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., and Eck, M.J. (2004). Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**, 711–723.
- Yen, L.F., Liu, X., and Cai, S. (1995). Polymerization of actin from maize pollen. *Plant Physiol.* **107**, 73–76.
- Zigmond, S.H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sichi, F., Forkey, J., and Pring, M. (2003). Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr. Biol.* **13**, 1820–1823.

***Article 2 : Un nouveau mécanisme de formation des câbles de filaments d'actine par une formine non-processive.***

**Alphée Michelot, Emmanuel Dériver, Rajaa Paterski-Boujemaa, Christophe Guérin, Shanjin Huang, François Parcy, Christopher J. Staiger, et Laurent Blanchoin.**

Cet article a fait l'objet d'une note dans Cell, jointe au manuscrit.

**Résumé :**

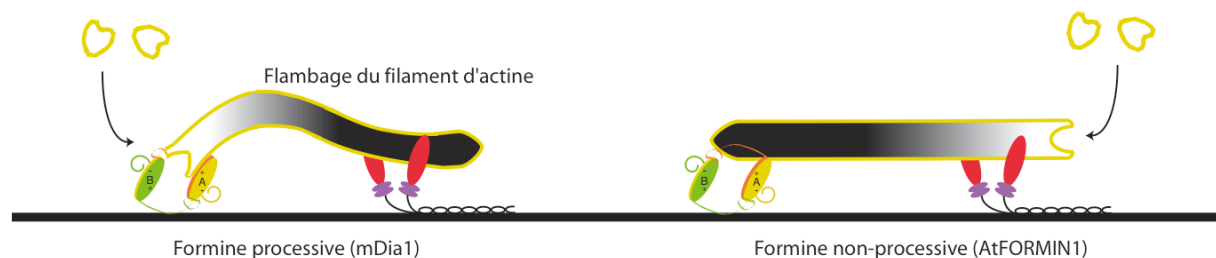
Dans tous les processus impliquant la motilité cellulaire, les cellules vivantes doivent pouvoir adapter rapidement les propriétés mécaniques du cytosquelette d'actine en fonction de la contrainte à exercer. Pour cela, les cellules eucaryotes sont capables d'organiser les microfilaments d'actine en différentes structures ayant les propriétés mécaniques recherchées. On retrouve de manière récurrente parmi les différentes espèces deux types d'organisations des filaments d'actine : les réseaux branchés par le complexe Arp2/3 et les réseaux de filaments parallèles appelés câbles de filaments.

A l'heure actuelle, la majorité des études s'intéressant à la dynamique *in vivo* et *in vitro* des structures élaborées de filaments concernent les réseaux branchés. Bien que les câbles de filaments d'actine jouent un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires tels que la division cellulaire ou la morphogenèse, très peu de choses sont connues à propos de la dynamique de ces structures (Yang and Pon, 2002), (Martin and Chang, 2006). Récemment, de nombreuses études ont suggéré un rôle important des protéines de la famille des formines pour la formation des câbles de filaments d'actine. En particulier, notre étude précédente a montré que chez la plante *Arabidopsis thaliana*, la formine FORMIN1 possédant les deux domaines FH1 et FH2 est un facteur de nucléation de l'actine capable sans aucun autre partenaire d'organiser les filaments d'actine en câbles (Michelot et al., 2005). Dans cette nouvelle étude, nous avons donc voulu comprendre par quel mécanisme la protéine FORMIN1 pouvait former ces structures organisées de filaments.

Toute cette étude se base sur la technique originale de microscopie à onde évanescente. Cette technique a été plusieurs fois utilisée pour visualiser en temps réel la

polymérisation de filaments d'actine et pour comprendre le mécanisme d'action de protéines interagissant avec l'actine (Amann and Pollard, 2001), (Fujiwara et al., 2002), (Kovar and Pollard, 2004), (Kovar et al., 2006). Cependant, nous avons au cours de ce travail développé la technique pour la rendre plus performante. Tout d'abord, nous avons réalisé des marquages de l'actine avec plusieurs molécules fluorescentes. Nous avons montré qu'à la longueur d'onde d'excitation laser de 532 nm, l'actine marquée avec les deux fluorophores rhodamine succinimidyl ester ou alexa 532 succinimidyl ester ont des propriétés fluorescentes très différentes. En effet, l'alexa 532 est beaucoup moins stable à la lumière excitatrice, et photoblanchit en moyenne 10 fois plus rapidement que la rhodamine. Cette propriété du marquage à l'alexa 532, qui pourrait apparaître comme un inconvénient à première vue, constitue en réalité un outil très performant. Une expérience réalisée avec la rhodamine présente l'avantage de pouvoir visualiser en temps réel toute l'actine polymérisée. En revanche, avec ce marquage, il est très difficile de distinguer dans des structures comportant plusieurs filaments d'actine, les extrémités barbées des filaments d'actine qui s'allongent, des extrémités barbées et/ou pointues qui au contraire ne s'allongent pas. Le marquage à l'alexa 532, au contraire, permet de distinguer les extrémités qui s'allongent (ce sont celles qui sont les plus fluorescentes) de celles qui ne s'allongent pas (ce sont celles qui sont le moins fluorescentes et disparaissent par photoblanchiment). En revanche, parce que l'actine marquée à l'alexa532 polymérisée photoblanchit rapidement, ce type de marquage permet difficilement de visualiser en temps réel toute l'actine qui a été polymérisée. Les deux types de marquage constituent donc des outils très complémentaires suivant que l'on veuille visualiser tout le filament d'actine polymérisé, où que l'on veuille observer un comportement particulier à l'une ou l'autre des extrémités du filament d'actine. Ces deux marquages ont été utilisés avec succès pour comparer le mécanisme d'action de FORMIN1 avec celui des autres formines (mDia1 et mDia2). Toutes les formines étudiées jusqu'à présent se comportent de manière processive, c'est-à-dire qu'elles coiffent l'extrémité barbée des filaments d'actine tout en permettant l'insertion de sous-unités d'actine (Pruyne et al., 2002), (Kovar et al., 2003), (Harris et al., 2004). Dans des expériences de microscopie à onde évanescente où l'on attache à la lame ces formines et des myosines inactivées par le NEM (N-ethylmaleimide), un filament d'actine qui se retrouve simultanément contraint à une extrémité par une formine et sur le côté par une myosine se courbe au fur et à mesure que les monomères d'actine s'insèrent à l'extrémité barbée des filaments (voir Figure 37 et (Kovar and Pollard, 2004)). Dans une expérience réalisée avec l'alexa 532, les filaments resteront fluorescents en un point fixe de la lame où la formine est attachée (voir Figure 37). De plus, la présence de la formine à l'extrémité barbée des filaments d'actine modifie leur vitesse d'élongation (Romero et al., 2004), (Kovar et al., 2006). La même expérience réalisée avec la formine

d'*Arabidopsis thaliana* FORMIN1 révèle un comportement tout à fait particulier de cette formine. Nous avons pu observer plusieurs événements successifs de nucléation provenant du même point de la lame. Le nombre de filaments formés en ce point de la lame varie entre un et cinq, suggérant que ce phénomène soit bien une caractéristique intrinsèque au mécanisme de nucléation de FORMIN1. Il est important de noter que FORMIN1 est un dimère en solution. Les filaments alors nucléés ne forment jamais de boucles, et les extrémités barbées des filaments s'éloignent toujours du centre de nucléation (voir Figure 37). De plus, les filaments s'allongent à une vitesse caractéristique d'une élévation de l'extrémité barbée. Tous ces résultats nous ont amenés à conclure que cette formine a un comportement non processif au contraire des autres formines étudiées à ce jour.



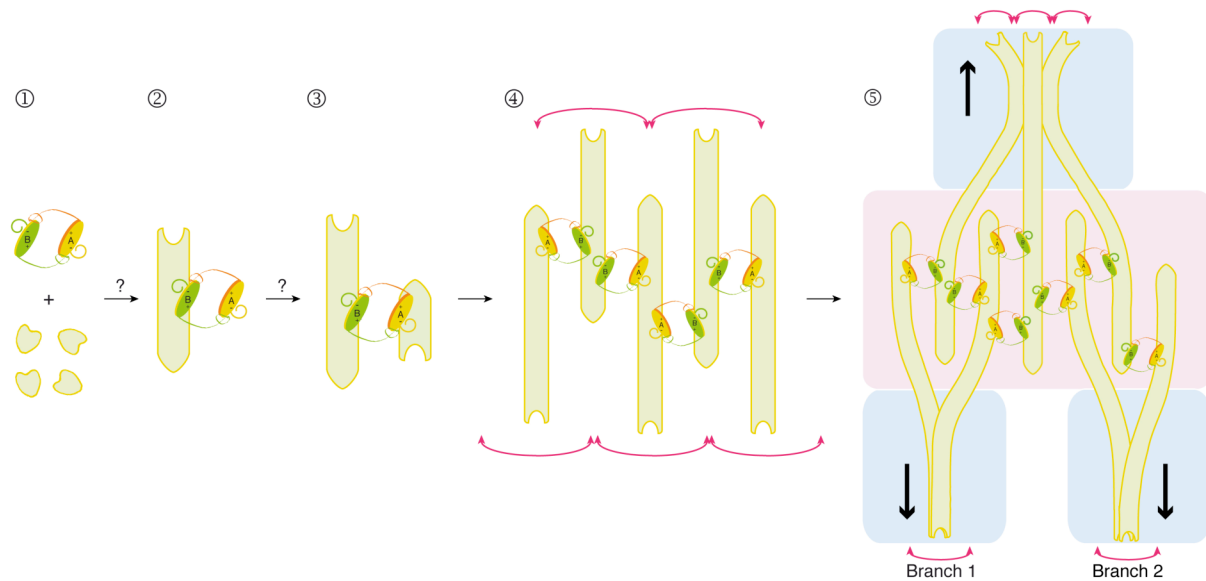
**Figure 37 : Caractérisation du comportement processif ou non processif des formines en microscopie à onde évanescence avec de l'actine marquée à l'alex-532.** Les filaments sont contraints en deux points fixes de la lame par une formine et une myosine inactivée. Dans le cas où la formine est processive (à gauche sur le schéma), l'insertion continue de sous-unités d'actine entre la formine et l'extrémité barbée provoque le flambage du filament. Au cours de l'élévation, le filament reste alors fluorescent en un point fixe de la lame, là où son extrémité barbée se trouve en contact avec la formine, alors que l'autre extrémité du filament photoblanchit. Dans le cas où la formine est non-processive (à droite sur le schéma), l'extrémité barbée, libre de s'allonger, s'éloigne du centre de nucléation, et le filament ne flambe pas.

Une hypothèse qui aurait pu expliquer nos résultats serait que la FORMIN1 pourrait se détacher de la lame pour rester en contact des extrémités barbées et "surfer" à l'extrémité barbée du filament qui s'allonge. Ceci est improbable car des événements de raboutage ont pu être observés sur des filaments initiés par FORMIN1, ce qui démontre que leur extrémité barbée est libre. Le comportement particulier de cette formine peut être compris au regard des propriétés biochimiques particulières de FORMIN1. Nous avons montré dans l'étude précédente que FORMIN1 possédant les deux domaines FH1 et FH2 a une affinité pour les extrémités barbées des filaments d'actine ( $K_d \approx 40$  nM) proche de son affinité pour le côté des filaments ( $K_d \approx 130$  nM). Pour expliquer le caractère non-processif de FORMIN1 nous proposons que cette protéine soit capable après la nucléation d'un nouveau filament d'actine (voir Figure 38, étape 1) de se déplacer de l'extrémité barbée du filament d'actine vers le côté du filament d'actine

(voir Figure 38, étape 2), ou elle reste capable d'initier un autre filament. En effet, nous avons aussi montré dans cette étude que FORMIN1 fixée sur le côté d'un filament préexistant préserve sa capacité de nucléer un nouveau filament d'actine (voir Figure 38, étape 3). Cette particularité est à l'origine du mécanisme de formation des câbles d'actine.

L'avancée technique majeure de ce travail est d'avoir pour la première fois montré que la technique de microscopie à onde évanescente est adaptée à l'étude de l'organisation dynamique de structures complexes de filaments d'actine. Nous avons ici utilisé cette technique pour comprendre l'élaboration progressive des câbles d'actine. Plusieurs études ont montrés par le passé que des polymères chargés négativement tels que des filaments d'actine se repoussent en solution aqueuse, mais que l'ajout de polycations ou de polypeptides basiques en concentration physiologique peuvent écranter les charges du filament. Ceux-ci peuvent alors former des contacts latéraux et s'associer en câbles de filaments d'actine. Cependant, la façon dont les filaments s'organisent pour former les câbles restent peu connues. Diez et al. ont montrés chez *Dictyostelium discoideum* que la polymérisation de nouveaux filaments d'actine dans les réseaux d'actine corticaux se faisait majoritairement le long de filaments préexistants, aboutissant progressivement à la formation de câbles de filaments (Diez et al., 2005). Nous reportons dans cette étude que la formation de câbles *in vitro* avec FORMIN1 se fait suivant un processus analogue. La présence de formine sur le côté d'un filament préexistant (voir Figure 38, étape 2) permet la nucléation de nombreux autres filaments (voir Figure 38, étape 3) qui s'allongent préférentiellement le long du filament préexistant (voir Figure 38, étape 4), formant progressivement des câbles épais de filaments d'actine par un mécanisme de type « fermeture-éclair » (voir Figure 38, étape 5). Ce processus est fortement dépendant du mouvement brownien (voir Figure 38, flèches rouges). Toute suppression des fluctuations thermiques des filaments d'actine, par exemple par des interactions non-spécifiques ou spécifiques via des myosines greffée sur la lame, inhibe totalement la formation des câbles d'actine.

Nous avons montré de plus que la géométrie des câbles d'actine dépend de la localisation des facteurs de nucléation. Dans la zone où FORMIN1 est répartie le long du filament préexistant, les nouveaux filaments nucléés sont capables de polymériser le long des filaments préexistants de façon parallèle mais aussi de façon anti-parallèle, menant dans cette zone à la formation de câbles constitués de filaments d'actine polarisés aléatoirement (voir Figure 38, étape 5, zone rose). En revanche, à l'extrémité des câbles de filaments, les filaments d'actine s'allongent tous avec la même polarité, et forment ainsi des câbles de filaments d'actine parallèles (voir Figure 38, étape 5, zone bleue).



**Figure 38 : Modèle de formation des câbles d'actine par la formine non-processive FORMIN1 (FH1FH2).** Après avoir nucléé un filament d'actine (étape 1), FORMIN1 se déplace sur le côté du filament par un mécanisme inconnu (étape 2). FORMIN1 est alors capable de nucléer un nouveau filament sur le côté du filament préexistant (étape 3). La nucléation progressive et localisée de multiples filaments initie la formation de la structure (étape 4). Les fluctuations thermiques des filaments dues au mouvement brownien (flèches rouges) permettent le regroupement des filaments en câble par un mécanisme de fermeture éclair (étape 5). Dans le zone où FORMIN1 est répartie le long du filament préexistant (en rose), les câbles ont une polarité aléatoire. A l'extrémité des câbles (zone bleue), les filaments ont tous la même orientation.



# **ARTICLE 2**





# A Novel Mechanism for the Formation of Actin-Filament Bundles by a Nonprocessive Formin

Alphée Michelot,<sup>1</sup> Emmanuel Derivery,<sup>1</sup> Rajaa Paterski-Boujemaa,<sup>1</sup> Christophe Guérin,<sup>1</sup> Shanjin Huang,<sup>2</sup> François Parcy,<sup>1</sup> Christopher J. Staiger,<sup>2</sup> and Laurent Blanchoin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Département Réponse et Dynamique Cellulaire  
Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale  
Centre National de la Recherche Scientifique  
Institut National de la Recherche Agronomique  
Université Joseph Fourier  
F38054 Grenoble  
France

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences and  
The Bindley Bioscience Center  
Purdue University  
West Lafayette, Indiana 47907-2064

## Summary

Actin-filament bundles (or cables) have a structural role during cell division and morphogenesis, but also serve as important “tracks” for the transport of materials during cytokinesis and polarized cell growth. However, the dynamic formation of these longitudinal actin-filament higher-order structures is not understood. Recently, several lines of evidence suggest that formins provide one avenue for the initiation of actin cables in vivo [1–3]. A popular model for the mechanism of polymerization of actin filaments by formin involves the processive movement of formin attached at the barbed end of an elongating filament [4]. In the present study, we use an in vitro system to reconstitute the dynamic formation of actin-filament bundles generated by *Arabidopsis* FORMIN1 (AFH1). To be able to visualize individual events in such a complex system, we used real-time evanescent-wave microscopy. Surprisingly, we find that AFH1 is a nonprocessive formin that moves from the barbed end to the side of an actin filament after the nucleation event. We show why this new mechanism of nucleation by a member of the formin family is important for bundle formation. Finally, we analyze the different parameters controlling the dynamic formation of such longitudinal actin-filament bundles.

## Results

### The Fluorescent Properties of Rhodamine- and Alexa-532-Labeled Actins Are Different

We used total-internal-reflection fluorescence microscopy (TIRFM) to study the dynamic formation of actin-filament bundles induced by *Arabidopsis* FORMIN1 (AFH1). We focused our study on AFH1, profilin, and actin because they are sufficient to reconstitute such structures in vitro [5]. To be able to distinguish individual

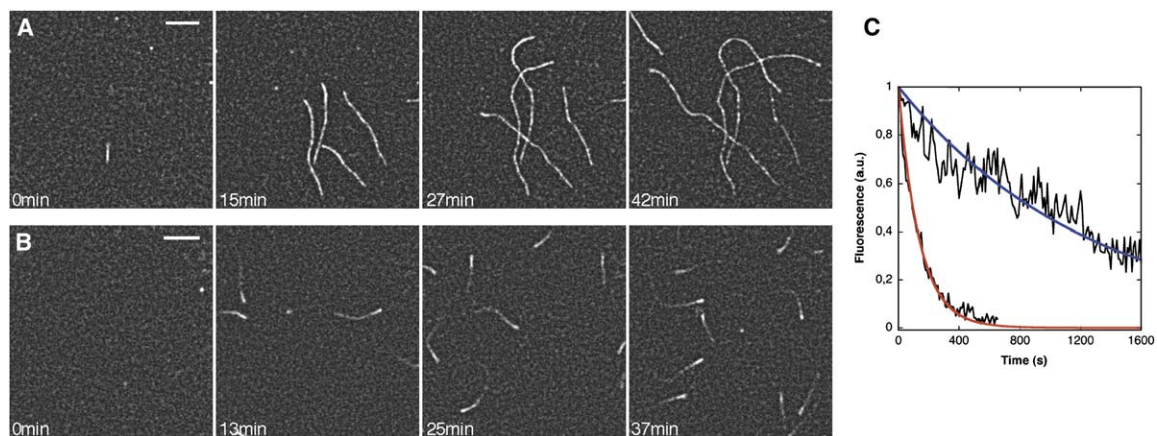
molecular events in this complex system, in which overlapping reactions contribute to actin-bundle formation (including nucleation, elongation, and bundling), we used fluorescent actin that was labeled on lysine residues with rhodamine or Alexa dyes (Figures 1A and 1B; Movies S1 and S2 in the Supplemental Data available online). The Alexa-532-actin fluorescence intensity decreased rapidly as a result of photobleaching, generating actin filaments with a comet-like appearance (Figures 1B and 1C (bottom curve); Movie S2) where the subunits near the growing ends are always brighter (Figure 1B; Movie S2). By comparison, actin filaments generated with rhodamine-labeled monomers maintained a more homogenous fluorescence intensity over the same period of observation (i.e., 20 min; Figures 1A and 1C (top curve); Movie S1). Thus, Alexa-532-actin appears to be a useful probe for identifying and monitoring polymerization at the barbed end of actin filaments.

### AFH1 Is a Nonprocessive Formin

We used both types of fluorescent actins bound to an excess of profilin to study the initial steps (i.e., nucleation and elongation) of filament assembly prior to actin-bundle formation. We focused our attention on actin filaments initiated by AFH1 at the surface of the cover glass by tracking filaments that remained attached by or near their end at the initial point of nucleation (Figures 2A and 2B; Movies S3 and S4). In this assay, it was possible to visualize multiple nucleation events from the same area ( $\leq 0.012 \mu\text{m}^2$ ) of the glass slide (red arrows, Figures 2A and 2B). This is characteristic of the nucleating activity of AFH1 (Figure 2; Movies S3 and S4; [5]). We were able to resolve each individual nucleation event when Alexa-532-labeled actin was polymerized in the presence of AFH1 (red arrow, Figure 2B; Movie S4). By analysis of the fluorescence intensity at the origin of nucleation (Figure 2B, red arrow), we obtained a perfect correlation between the number of fluorescent pulses (i.e., five) at the origin of nucleation (Figure 2C) and the number of actin filaments growing from this origin (Figure 2B, yellow arrows). These results indicate that, in some cases, there may be more than a dimer of AFH1 at the origin of nucleation allowing the ability to nucleate multiple actin filaments. Alternatively, each dimer of AFH1 may be capable of nucleating in succession several actin filaments. The distribution of nucleation events that were from the same origin and were analyzed from TIRFM experiments is similar for two different concentrations of AFH1 and typically ranged from 1 to 5 (Figure 2D), with a few larger structures representing less than 1% of the total events.

It is also instructive to consider the polarity of Alexa-532-labeled actin filaments generated by AFH1. Surprisingly, the brightest part of actin filaments (yellow arrows, Figure 2B; Movie S4), corresponding to the growing barbed ends, always moves away from the initial origin of nucleation (red arrow) as the filaments elongate at a rate of  $8.1 \pm 1.2 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . The polarity of actin filaments

\*Correspondence: laurent.blanchoin@cea.fr



**Figure 1. The Fluorescent Properties of Actin Filaments Labeled with Rhodamine or Alexa-532 Fluorophores Are Different**

Conditions: NEM-myosin was attached to the cover glass before addition into the flow cell of  $0.75\ \mu\text{M}$  rhodamine-labeled actin or Alexa-labeled actin monomer in the presence of  $1.5\ \mu\text{M}$  profilin. Images were taken at the indicated time during polymerization.

(A) Time-lapse evanescent-wave microscopy of rhodamine-labeled actin polymerization. The stability of the fluorophore bound to actin enabled us to visualize the whole polymerization process as well as the resulting actin filaments.

(B) Time-lapse evanescent-wave microscopy of Alexa-532-labeled actin polymerization. The comet-like appearance of actin filaments is due to the photobleaching of the fluorophore. We were able to follow only the newly polymerized part of the filaments. This does, however, favor the identification of the growing barbed ends.

(C) Variation of the fluorescence intensity over time for both labeled actins under TIRFM. The typical photobleaching time scale is ten times longer for rhodamine actin (top “noisy” curve) than for Alexa-532 actin (bottom “noisy” curve) as determined by the exponential decay of fluorescence (blue curve for rhodamine actin, red curve for Alexa-532 actin).

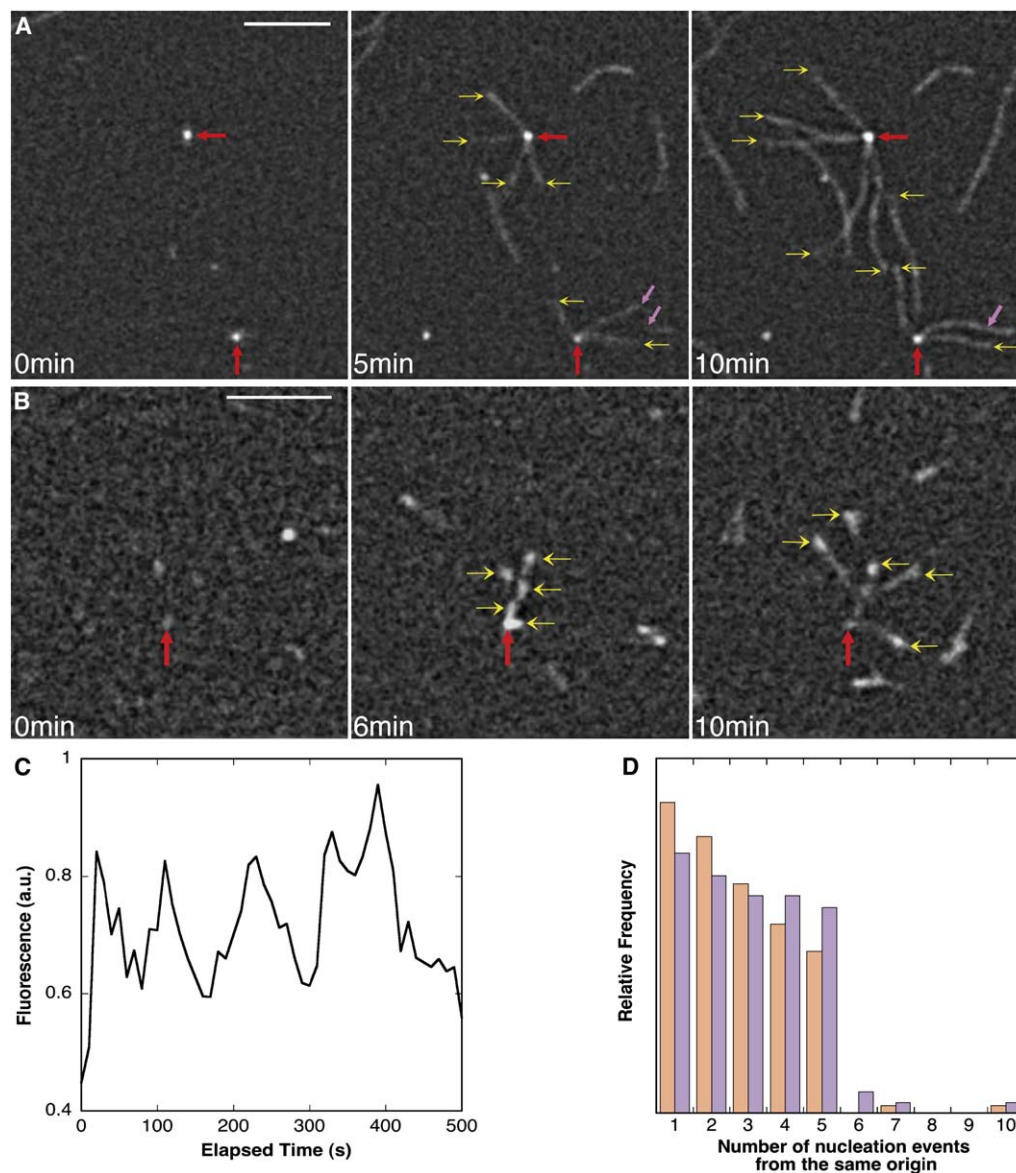
Scale bars represent  $5\ \mu\text{m}$ .

generated by AFH1 was identical regardless of whether a single or multiple nucleating events occurred from the same site (data not shown). This is different from nucleation by a processive formin, such as mDia2, where the brightest part of the filament remains at the origin of nucleation (red arrow, [Movie S5](#); e.g., [6]). Indeed, with a processive formin, labeled actin monomers are continuously inserted between the actin-filament barbed end and the formin attached at the glass slide ([6]; [Movies S5 and S6](#)). Moreover, all processive formins tested until now modify the rate of elongation at the barbed ends of actin filaments in the presence of profilin ([7, 8]; [Movie S6](#)). In our case, the rate of elongation at the barbed ends was similar for actin filaments nucleated in the presence or absence of AFH1:  $k_+ = 7.8 \pm 1.2\ \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for Alexa-532-labeled actin bound to profilin ([Figure 1B](#)) and  $k_+ = 8.1 \pm 1.2\ \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for Alexa-532-labeled actin bound to profilin in presence of AFH1 ([Figure 2B](#)). By comparison, the rate of elongation increased from  $k_+ = 5.9 \pm 0.7\ \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for rhodamine actin bound to profilin up to  $k_+ = 24.5\ \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for rhodamine actin bound to profilin in the presence of mDia1 ([Movie S6](#)). Finally, the presence of both NEM-myosin and processive formins (mDia1 or mDia2) attached to the cover glass often induces a buckling of actin filaments ([6]; [Movies S5 and S6](#)). No buckling events were observed for AFH1 [5]. An elongation assay performed in the presence of capped barbed ends shows that AFH1 does not bind to filament pointed ends ([Figure S2](#)). This discounts the possibility that AFH1 is nucleating like the Arp2/3 complex, i.e., remaining attached to pointed ends. Moreover, annealing events can be observed on elongating filaments generated by AFH1 in agreement with AFH1 not “surfing” at the elongated barbed end of an actin filament ([Figure 2A](#), pink arrows; [Movie S4](#)).

#### AFH1 Attached to the Side of a Pre-existing Actin Filament Is Able to Nucleate New Filaments

The nonprocessivity of AFH1 may be explained by its high affinity for the side of actin filaments ( $K_d = 0.13\ \mu\text{M}$ ; [5]). To better understand the mechanism of action of AFH1, we determined whether AFH1 bound to the side of an actin filament was able to nucleate new actin filaments. After the addition of rhodamine-labeled actin monomers bound to profilin, we observed dense polymerization from AFH1 bound to pre-existing filaments, whereas almost no polymerization was detected on other parts of the slide ([Figure 3A](#); [Movie S7](#)). This strongly suggests that AFH1 bound to actin filaments is able to nucleate new actin filaments. Using pyrene fluorescence, we confirmed this hypothesis by a kinetic-polymerization assay from actin seeds. The polymerization of pyrene-labeled actin monomers from a mixture of actin filaments or actin filaments bound to *Arabidopsis* VILLIN1 (another actin-filament side-binding protein but with no nucleating activity; [9]) elongated at the same rate ([Figure 3B](#)). However, the polymerization is faster when actin filaments are incubated with AFH1 ([Figure 3B](#)). This is consistent with AFH1 being an active nucleator when bound to the side of a pre-existing actin filament.

The use of Alexa-532-labeled actin allowed us to visualize individual nucleation events (red arrow, [Figure 4C](#)) during the polymerization of actin filaments from Alexa-532-phalloidin-labeled actin filaments decorated with AFH1 ([Figure 4B](#); [Movie S12](#)). Actin filaments nucleated from the side of the pre-existing filaments have their brightest ends (yellow arrows, [Figure 4B](#)) moving away from the origin of nucleation on the pre-existing filaments (red arrow, [Figure 4B](#)), in agreement with the nonprocessivity of AFH1.



**Figure 2. AFH1 Is a Nonprocessive Formin**

Conditions: AFH1, FH1-FH2-Cter (40 nM), was attached to the cover glass before addition into the flow cell of 0.75  $\mu\text{M}$  rhodamine- or Alexa-532-labeled actin monomer in the presence of 1.5  $\mu\text{M}$  profilin. Images were taken at the indicated time during polymerization.

(A) Time-lapse evanescent-wave microscopy of rhodamine-labeled actin polymerization in the presence of AFH1. The origin of nucleation by AFH1 is indicated by a red arrow. Filaments that have grown out from the origin of nucleation are indicated by yellow arrows. The rates of elongation for these filaments are typical of barbed-end growth (i.e.,  $8.1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), and an annealing event is visible at the elongating barbed end of an actin filament (pink arrows).

(B) Time-lapse evanescent-wave microscopy of Alexa-532-actin polymerization in the presence of AFH1. Actin-filament barbed ends (yellow arrows) are moving away from the initial origin of nucleation (red arrow), showing the nonprocessive behavior of AFH1.

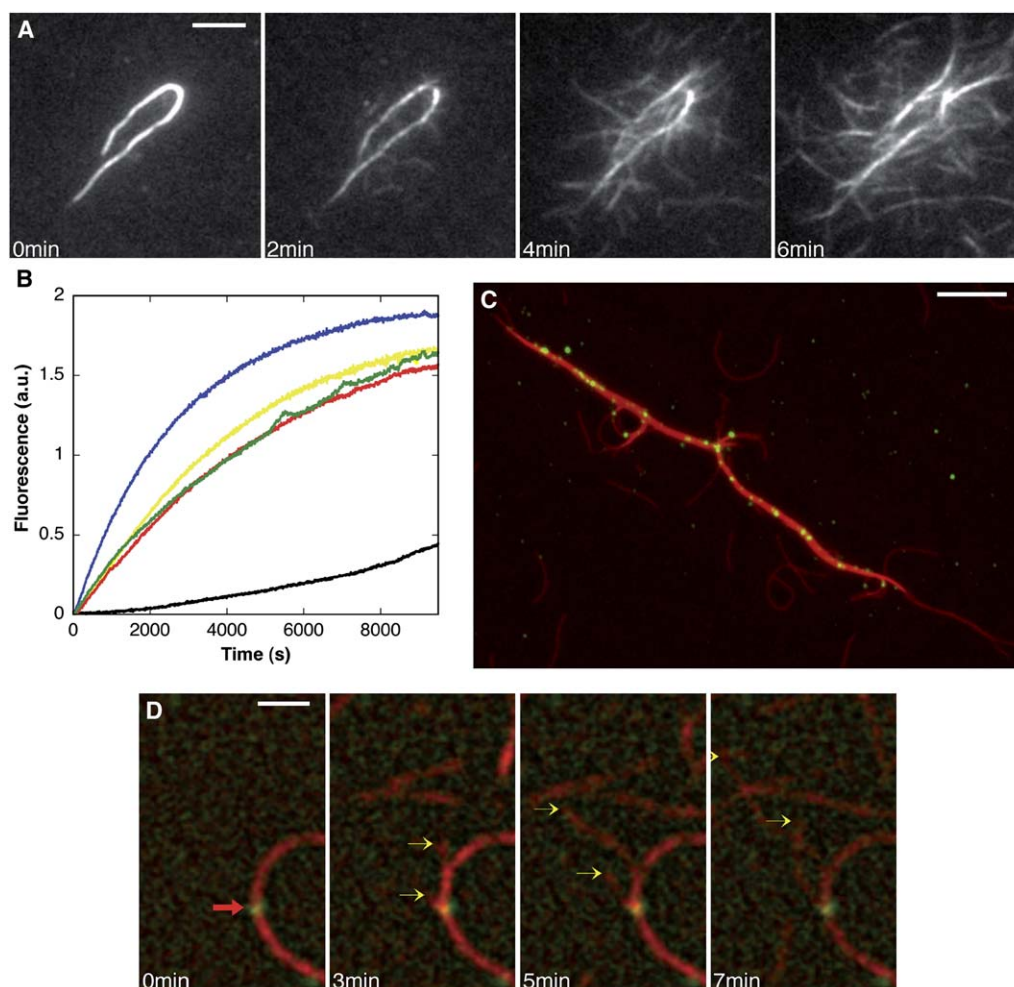
(C) Quantification of fluorescence intensity at the origin of nucleation (red arrow in [B]) enables us to distinguish five consecutive pulses of fluorescence corresponding to five nucleation events and the five resulting actin filaments in [B].

(D) Quantification of the relative frequency of nucleation events from the same origin. Differently colored bars represent two different concentrations of AFH1 attached to the cover glass in independent experiments (orange, 40 nM AFH1 and purple, 100 nM). This distribution was similar for AFH1, GST-FH1-FH2-His, and His-FH1-FH2-His constructs, ruling out a possible effect of GST on the behavior of AFH1. Scale bars in (A) and (B) represent 5  $\mu\text{m}$ .

To visualize the location of AFH1 during nucleation and subsequent elongation events, we incubated rhodamine-phalloidin-labeled actin filaments with a construct where AFH1 is fused to green fluorescence protein (GFP). At steady state, GFP-AFH1 associated with actin-filament bundles at numerous locations

(Figure 3C). By TIRFM, we observed that GFP-AFH1 remains bound to the side of the pre-existing filaments after nucleation of new filaments (Figure 3D; Movie S8), consistent with nonprocessivity and with the ability of AFH1 to simultaneously bind the side of filaments and nucleate.





**Figure 3. AFH1 Has Nucleation Activity When Bound to the Side of an Actin Filament**

(A) AFH1 is able to nucleate new filaments from the sides of a pre-existing filament. Conditions: Alexa-532-phalloidin-labeled actin filaments (180 nM) were incubated for 30 s with 50 nM AFH1 and then immobilized on the coverslip of a flow cell blocked with 1% BSA. Polymerization was initiated by the addition of 0.75  $\mu$ M actin monomers (rhodamine-labeled) and 1.5  $\mu$ M profilin. Images were taken at the indicated time during polymerization. Numerous polymerization events were observed from the pre-existing filaments decorated with AFH1, whereas almost no polymerization was observed on the surrounding part of the cover glass.

(B) AFH1 nucleates actin-filament formation with the same efficiency whether it is free or bound to pre-existing filaments. To demonstrate that AFH1 bound to filaments was able to nucleate filaments with the same efficiency as free AFH1, we conducted pyrene-actin polymerization assays with 2  $\mu$ M actin and 2  $\mu$ M profilin alone (black), with 10 nM AFH1 (yellow), with 50 nM phalloidin filaments (red), with 50 nM phalloidin filaments and 10 nM AtVILLIN1 (green), or with 50 nM phalloidin filaments and 10 nM AFH1 (blue). The concentration of actin-filament barbed ends generated from each experiment was 0.016 nM for 10 nM AFH1 alone, 0.014 nM for 50 nM phalloidin actin filaments, 0.016 nM for 50 nM phalloidin actin filaments with 10 nM AtVILLIN1, and 0.034 nM for 50 nM phalloidin actin filaments with 10 nM AFH1.

(C) Direct visualization of actin-filament bundles decorated with GFP-AFH1. Actin was polymerized with GFP-AFH1 for 30 min in the presence of rhodamine phalloidin and then diluted to 10 nM before observation with wide-field fluorescence microscopy.

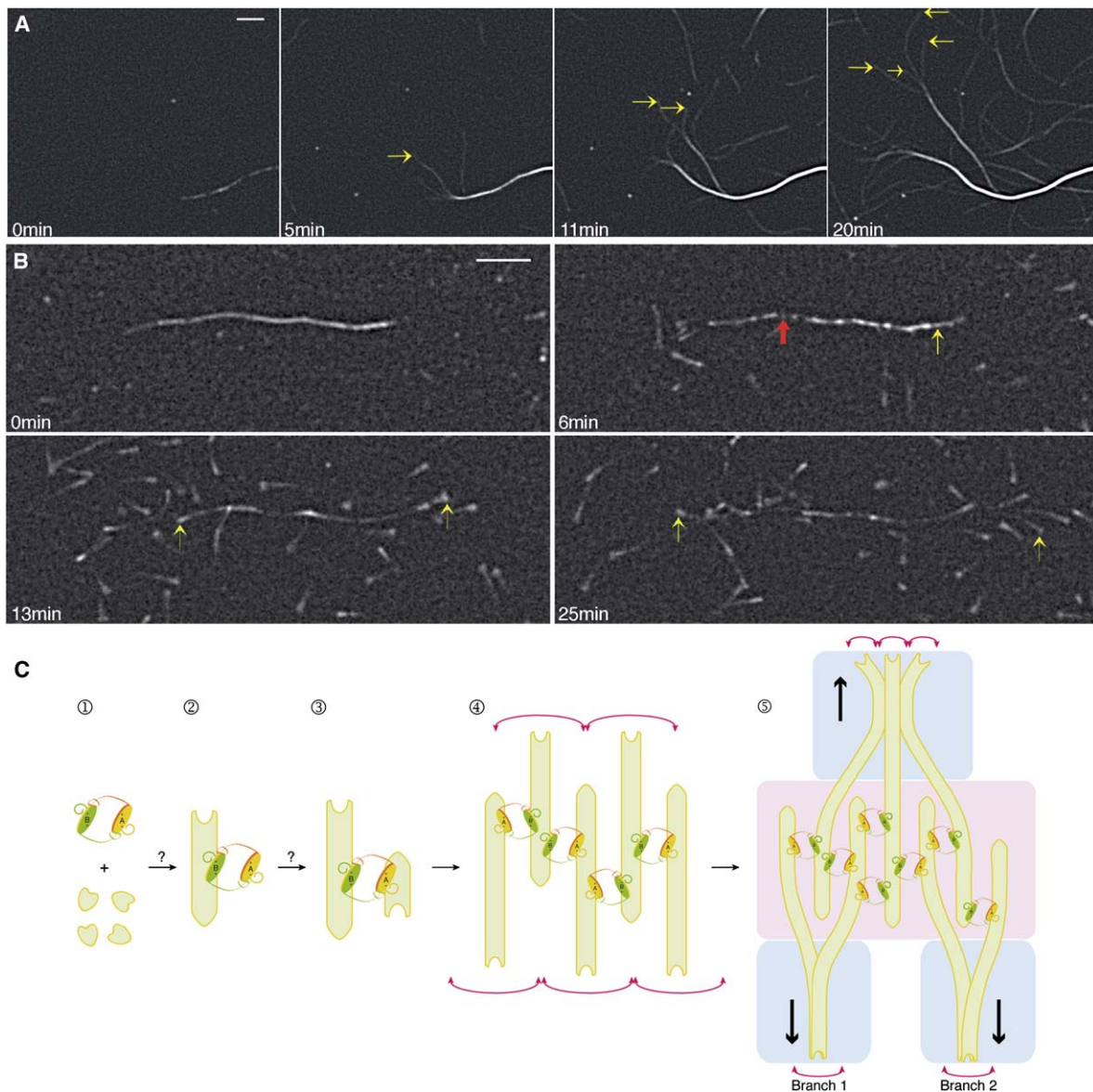
(D) GFP-AFH1 can nucleate new actin filaments when bound to the side of a pre-existing filament. Rhodamine-phalloidin-labeled actin filaments (180 nM) were preincubated with 50 nM GFP-AFH1 and then immobilized on the cover glass of the flow cell before addition of 0.75  $\mu$ M rhodamine-labeled actin and 1.5  $\mu$ M profilin. By rapidly switching between laser illumination of the evanescent wave (to observe polymerization) and wide-field fluorescence microscopy (to visualize GFP-AFH1), we were able to monitor actin-filament growth (yellow arrows) at a rate of elongation =  $8 \pm 1 \mu\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$  from GFP-AFH1 (red arrow) bound to the side of pre-existing filaments.

Scale bars represent 5  $\mu$ m in (A) and (C) and 2  $\mu$ m in (D).

### AFH1 Induces Actin-Bundle Formation by Promoting the “Zippering” of Actin Filaments

We next studied the dynamic formation of actin bundles generated by AFH1 (Figures 4A and 4B; Movies S9, S11, and S12). The bundling activity of AFH1 depends upon the presence of an FH1 domain [5]; however, FH1 domain alone does not bind actin monomers or filaments (data not shown). Three events are particularly clear

during the kinetic formation of actin bundles. First, the fluorescence intensity of the original actin filament increased dramatically over time, in agreement with the continuous nucleation of new actin filaments by AFH1 attached to the side of the pre-existing actin filament (Figure 4A; Movie S9). Second, the formation of actin bundles required a “zippering” event near the tip of growing barbed ends of actin filaments (Figure 4A,



**Figure 4. Dynamic Formation of Actin-Filament Bundles by AFH1**

Conditions: Rhodamine-phalloidin-labeled actin filaments (180 nM) were incubated with 50 nM AFH1 and then immobilized on the coverslip of a flow cell blocked with 1% BSA. To allow filament assembly, we added 0.75  $\mu\text{M}$  actin monomers (rhodamine-labeled) and 1.5  $\mu\text{M}$  profilin to the flow cell. Images were taken at the indicated time during polymerization.

(A) Time-lapse evanescent-wave microscopy of the formation of actin bundles by AFH1. A wave of fluorescent filaments emanates from the pre-existing actin filament consistent with actin nucleation by AFH1 bound to the original actin filament. Zippering of actin filaments occurs near the growing barbed ends (yellow arrows) and favors actin-filament-bundle formation.

(B) Alexa-532-labeled actin allowed us to understand the mechanism of formation of actin bundles. Conditions: Alexa-532-phalloidin-labeled actin filaments (180 nM) were pre-incubated with 50 nM AFH1 and then immobilized on the coverslip of a flow cell blocked with 1% BSA. To allow assembly, we added 0.75  $\mu\text{M}$  actin monomers (Alexa-532-labeled) and 1.5  $\mu\text{M}$  profilin. AFH1 favors a “clustered” nucleation of actin filaments (red arrow) that are subsequently zippered together (yellow arrows) while elongating. This zippering effect leads to a random organization of actin filaments in the nucleation zone, but favors a parallel actin-filament organization away from the origin of nucleation. The rates of elongation for individual actin filaments before their integration into the bundle or when extending along another actin filament were the same (i.e.,  $5.5 \pm 1.5 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), suggesting that the growth of actin filaments inside the bundles was not sterically limited. Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

(C) Model for the dynamic formation of actin bundles by nonprocessive FORMIN1 (AFH1). We propose that AFH1 moves from the end to the side of an actin filament after nucleation by an uncharacterized mechanism (steps 1 and 2). AFH1 bound to the side of a pre-existing filament can nucleate a new actin filament (step 3) and organizes actin filaments into bundles (steps 4 and 5). Thermal fluctuations favor filament-filament interaction (red arrows, step 4). However, the stiffness of actin-filament structure inhibits the amplitude of the thermal fluctuation (decreased size of red arrows, step 5) and induces branch formation (step 5). The direction of the zippering follows actin-filament elongation (black arrows, step 5). Actin bundles are in antiparallel orientation near the origin (pink zones, step 5) of nucleation and in parallel orientation away from the origin of nucleation (blue zone, step 5).

yellow arrows; [Movie S9](#)). Third, this zippering of actin filaments is promoted by AFH1 that favors a “clustered” nucleation of actin filaments ([Figures 4A and 4B](#)) and by the Brownian motion that promotes actin-filament contact ([Figure 4A](#), yellow arrows; [Movie S9](#)). Similar experiments done with mammalian mDia2 demonstrate that mDia2 is able to generate actin bundles, in agreement with a previous report [10]. Like AFH1, mDia2 is able to nucleate a new actin filament when bound to the side of a pre-existing filament. Distinct from AFH1, mDia2 generates actin filaments that buckle, consistent with it being processive while bound to the side of a pre-existing filament ([Movie S10](#)).

### AFH1 Organizes Actin Filaments into Antiparallel and/or Parallel Bundles

The use of Alexa-532 actin was crucial for studying the polarity of individual actin filaments during the formation of bundles. Specifically, the rapid decrease of the fluorescence from Alexa-532 actin enabled us to follow the growth of individual actin filaments inside or along the actin bundles ([Figure 4B](#), yellow arrows; [Movie S12](#)). The brightest parts of actin filaments, corresponding to the elongating barbed ends (rate of elongation,  $5.5 \pm 1.5 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), were observed to pass each other near the origin of nucleation, suggesting that some of the actin filaments that form actin bundles were in antiparallel orientation ([Figure 4B](#); [Movie S12](#)). However, as actin filaments elongated, all the barbed ends were growing away from the origin of nucleation generating parallel bundles ([Figure 4B](#); [Movie S12](#)). During the full process of actin-filament-bundle formation, no sliding of polymerized filaments was observed, suggesting that actin filaments are crosslinked at least at the original point of nucleation.

### Discussion

This study reports on a unique mechanism for a member of the formin family of actin nucleators. Remarkably, after nucleation of an actin filament, AFH1 does not remain attached to the growing barbed end as would be expected for a processive nucleator, but rather it moves to the side of the actin filament, thereby releasing the barbed end. This behavior is independent of the presence of profilin (data not shown). We suggest that this mechanism of action is favored by the strong affinity of AFH1 for the side of an actin filament ( $K_d = 0.13 \mu\text{M}$ ; [5]). AFH1 does bind with a higher affinity to the actin-filament barbed end ( $K_d = 40 \text{ nM}$ ; [5]); however, the concentration of barbed ends is at least an order of magnitude lower than the concentration of binding sites along the side of an actin filament. AFH1-FH1-FH2 was unable to completely block assembly at filament barbed ends in an elongation assay or inhibit capping by *Arabidopsis* capping protein (AtCP) ([Figure S2](#); [5]). Moreover, its nucleation activity is completely abolished in the presence of an equimolar amount of capping protein, consistent with weak or transient binding to filament barbed ends [5]. From the current work, we cannot make any firm conclusions about the exact mechanism of nucleation by AFH1, because the resolution of the TIRFM assay is around  $0.5 \mu\text{m}$  (about 166 subunits long). AFH1 may act as a processive formin in an early step (i.e., actin

filaments less than  $\approx 100$  subunits long) and then slides to the side in a time scale not observable in our assay. Other formins including mammalian FRL1 and mDia2 [10] and yeast Bnr1 [11] have been shown to bind to the side and generate filament bundles. However, the affinity for the interaction with the side of an actin filament varies substantially, from the tight binding of AFH1 and FRL1, ( $K_d \sim 0.1 \mu\text{M}$ ; [12]) to the weak binding of mDia1 ( $K_d \sim 3 \mu\text{M}$ ; [12]). Recent work suggests that FRL1 shares the same region for side binding and end binding, whereas mDia2 has different regions responsible for each activity [10]. We report here that mDia2 is still processive when bound to the side of an actin filament ([Movie 10](#)). However, we cannot exclude in the case of mDia2 that the side binding may affect quantitatively its nucleating activity and/or processivity, in which case the importance of the side-binding versus processive nucleation needs further investigation. Obviously more works need to be done on the structural relationship between filament side binding, nucleation, and processive elongation. Nevertheless, AFH1 seems to be the first example of a formin family member that does not exhibit processive behavior at filament ends.

The direct visualization with TIRFM of bundle formation by AFH1 provides insight into the tight relationship between nonprocessivity and the mechanism of bundle formation. We have developed a simple model ([Figure 4C](#)) that predicts a general mechanism for the dynamic formation of actin bundles. The mechanism of bundle formation proposed for AFH1 is somewhat similar to a model for the formation of filopodia-like bundles in vitro and in vivo [13, 14]. However, the model for filopodia-like bundles requires tight coordination between an activated nucleator (Arp2/3 complex) and a bundler (fascin). Here, a single protein accomplishes both functions. Two important physical phenomena may contribute to the zippering mechanism ([Figure 4C](#), black arrows) and will affect the bundling efficiency independent of the presence of actin-binding proteins. First, the Brownian motion, which induces thermal fluctuations of the growing ends, possibly favors to some extent the filament-filament interaction ([Figure 4C](#), red arrows). Further, we might imagine that if the thermal fluctuations of actin filaments are too great, actin filaments coming into contact with each other may break or dissociate from the bundles. Second, the overall flexibility of an actin filament is a potential determinant of bundle formation. Our results suggest that there is a critical stiffness of actin filaments organized into bundles above which thermal fluctuations are too weak to induce the zippering. The resulting effect is the generation of thick branches from the original bundles ([Figure 4C](#), Step 5, branches 1 and 2).

Using Alexa-532-labeled actin, we determined that actin bundles have a random polarity at the origin of nucleation ([Figure 4C](#), pink zones), but as actin filaments elongate, all barbed ends become oriented in the same direction at both ends of the bundles ([Figure 4C](#), blue zone). The overall polarity of bundles is therefore mostly parallel. FRL1 and mDia2 generate bundles with a random orientation [10].

The use of Alexa-532 actin in TIRFM will be of a great interest in the future to study the dynamic behavior of higher-order actin-based structures. For example, this probe could facilitate understanding of the coordination

between bundles of actin filaments generated by formins and actin-filament networks generated by Arp2/3 complex. Finally, we should pay particular attention to the role of contractile proteins in the regulation of the dynamic formation of higher-order actin-filament arrays. As a starting point, we report here that interaction of actin bundles with myosin II is a possible mechanism for bundle dissociation (Movie S11).

#### Supplemental Data

Supplemental Data include Experimental Procedures, two figures, and twelve movies and are available with this article online at: <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/16/19/1924/DC1/>.

#### Acknowledgments

We thank Dr. Robert Robinson for his advice on the model of actin-filament bundling by AFH1. We are grateful to Dr. Henry N. Higgs for providing mammalian formins and for performing analytical ultracentrifugation experiments with AFH1. This work was funded through grants from the Actions Thématiques et Initiatives sur Programmes et Equipes Plus (ATIP+) and Contract Plan Epargne Région to L.B. and from the National Research Initiative of the USDA Cooperative State Research, Education, and Extension Service, grant number 2002-35304-12412 to C.J.S.

Received: April 20, 2006

Revised: June 28, 2006

Accepted: July 21, 2006

Published: October 9, 2006

#### References

1. Evangelista, M., Zigmond, S., and Boone, C. (2003). Formins: Signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* 116, 2603–2611.
2. Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4, 626–631.
3. Kobiela, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* 6, 21–30.
4. Zigmond, S.H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sicheri, F., Forkey, J., and Pring, M. (2003). Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr. Biol.* 13, 1820–1823.
5. Michelot, A., Guerin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2005). The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell* 17, 2296–2313.
6. Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14725–14730.
7. Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119, 419–429.
8. Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* 124, 423–435.
9. Huang, S., Robinson, R.C., Gao, L.Y., Matsumoto, T., Brunet, A., Blanchoin, L., and Staiger, C.J. (2005). Arabidopsis VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *Plant Cell* 17, 486–501.
10. Harris, E.S., Rouiller, I., Hanein, D., and Higgs, H.N. (2006). Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J. Biol. Chem.* 280, 14383–14392.
11. Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2005). Differential activities and regulation of *S. cerevisiae* formins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J. Biol. Chem.* 280, 28023–28033.
12. Harris, E.S., Li, F., and Higgs, H.N. (2004). The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* 279, 20076–20087.
13. Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2003). Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160, 951–962.
14. Haviv, L., Brill-Karniely, Y., Mahaffy, R., Backouche, F., Ben-Shaul, A., Pollard, T.D., and Bernheim-Groswasser, A. (2006). Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4906–4911.





# A Novel Mechanism for the Formation of Actin-Filament Bundles by a Nonprocessive Formin

Alphée Michelot, Emmanuel Derivery,  
Rajaa Paterski-Boujemaa, Christophe Guérin,  
Shanjin Huang, François Parcy,  
Christopher J. Staiger, and Laurent Blanchoin

## Supplemental Experimental Procedures

### Protein Expression and Purification

Actin was isolated from rabbit skeletal-muscle acetone powder [S1]. Monomeric Ca-ATP-actin was purified by gel-filtration chromatography on Sephacryl S-300 [S2] at 4°C in G buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM DTT). Actin was labeled on Cys-374 to a stoichiometry of 0.8 to 1.0 with pyrene iodoacetamide [S3]; as modified by Pollard [S4] or on lysines with rhodamine or Alexa-532 according to Isambert et al. [S5]. Mg-ATP-actin was prepared by incubation of Ca-ATP-actin on ice with 0.2 mM EGTA and an 11-fold molar excess of MgCl<sub>2</sub> over actin and used within 1 hr. Actin was polymerized by addition of one-tenth volume of 10× KMEI (500 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, and 100 mM imidazole-HCl [pH 7.0]). Profilin [S6], *Arabidopsis* VILLIN1 [S7], *Arabidopsis* capping protein (Atcp) [S8], and GST-tagged-*Arabidopsis* FORMIN1 FH1-FH2 domains [S9] were purified as described. Sedimentation-velocity ultracentrifugation on AFH1, FH1-FH2 domains reveals a single species of 5.5 S and a frictional ratio of 2.16, which is similar to mammalian formins [S10] and consistent with AFH1, FH1-FH2 construct being a dimer (Figure S1). For production of a fluorescent version of AFH1-FH1-FH2, the GFP coding sequence was inserted into the formin expression vector by bacterial recombination. For this purpose, the mGFP5 coding sequence [S11] was amplified with the oligonucleotides 5'-ATCCTCCAAATCGGATCTGATCGAAGGTCGGTTCAGTAAAGGAGAAGAAC-3' and 5'-AGAAGATAGTAAGTGAAGATTGCAAACCTTGCCGCTGTTTGATAGTTCATCCATG-3', which add flanking sequence for recombination. The pGex-4T1 expression vector containing the coding sequence for FH1-FH2-Cter domains was linearized with the BamHI restriction enzyme, and a mixture of the digested vector and amplified fragment was transformed into *E. coli* for recombination. Positive clones were detected on the basis of their fluorescence, and vector was verified by restriction digests and sequencing.

### Flow-Cell Preparation

Glass flow cells were prepared according to Kovar et al. [S12]. They were cleaned and coated, depending on the assay, with formin and/or NEM-myosins, actin filaments stabilized with Alexa-532 phalloidin or rhodamine-phalloidin and decorated or not with AFH1, FH1-FH2 construct, and then washed extensively with 1% BSA. Actin monomers bound to profilin were diluted in fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 3 mg/ml glucose, 20 µg/ml catalase, 100 µg/ml glucose oxidase, and 0.5% methylcellulose to induce polymerization. After injection into the flow cell, image acquisition began as soon as possible (typically 15 s after injection).

### Total-Internal-Reflection Fluorescence Microscopy

Time course of rhodamine-actin and Alexa-532-actin polymerization was observed on an Olympus IX-71 inverted microscope equipped with a 60×, 1.45 NA Planapo objective (Olympus, Melville, New York) and modified as described by Amann and Pollard [S13] to receive total-internal-reflection fluorescence microscopy (TIRF) illumination. The laser used for these experiments was an Omicron Laserage LAFE 1007 (Latronics, Aachen, Germany) emitting a 532 nm wavelength and limited in power to a range between 10 and 33 mW, depending on the angle of incidence of the beam. The time course of actin polymerization was acquired at 10 s or 20 s time intervals with a Hamamatsu ORCA-ER camera (Hamamatsu Photonics Deutschland) with MetaMorph version 6.2r6 (Universal Imaging, Downingtown, Pennsylvania).

### Dual-Color Microscopy Experiment

A dual-color fluorescence-microscopy experiment was performed to observe the nucleation of actin filaments with GFP-AFH1. Actin filaments were observed with the TIRF illumination as described above, whereas GFP-AFH1 was observed by epifluorescence illumination. A rapid switch between both sources allowed us to follow both the localization of GFP-AFH1 and actin-filament elongation. Red and green images were then merged together with MetaMorph.

### Data Analysis

Elongation rates were determined by measuring filament lengths with MetaMorph during actin-filament elongation. Rates were converted from µm per s<sup>-1</sup> to subunits per s<sup>-1</sup> by using 333 actin monomers per micrometer and to µM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> according to the concentration of actin monomers in the reaction mixture [S14]. Local fluorescence intensities were measured with MetaMorph. Monoexponential fits were made to the plots of fluorescence intensities over time. All fits were generated with Kaleidagraph v3.6 software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania).

### Actin-Pyrene Nucleation Assay

Actin nucleation was performed as described in [S15]. Two micromolars of Mg-ATP-monomeric actin (10% pyrene labeled) complexed with 2 µM profilin was polymerized at room temperature by the addition of one-tenth volume of 10× KMEI. Experiments were conducted in the presence or in the absence of 50 nM phalloidin-stabilized actin filaments, and in the presence or in the absence of 10 nM AFH1 or 10 nM VILLIN1. The polymerization was followed by changes in pyrene fluorescence by using a Xenius SAFAS fluorimeter (Safas SA, Monaco). The concentrations of barbed ends were estimated at the 50% point of polymerization with Kaleidagraph.

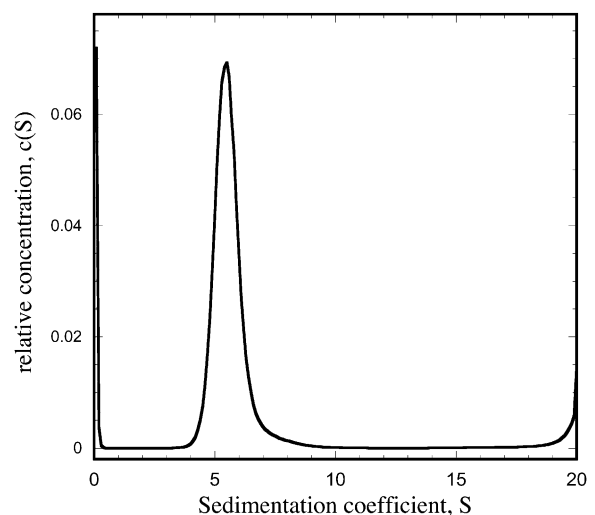


Figure S1. AFH1 Is a Dimer

Sedimentation-velocity analytical ultracentrifugation of 1 µM of AFH1 (peak fraction from Superdex200 Chromatography) in 5 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT. The major species (>90%) sedimented at 5.5 S. The calculated frictional ratio is 2.16, which is similar to that of FRL1 [S10]. Conversion of these parameters to an apparent mass assuming an elongated shape gave a value of 197 kDa, very close to the calculated mass for a dimer 190 kDa.

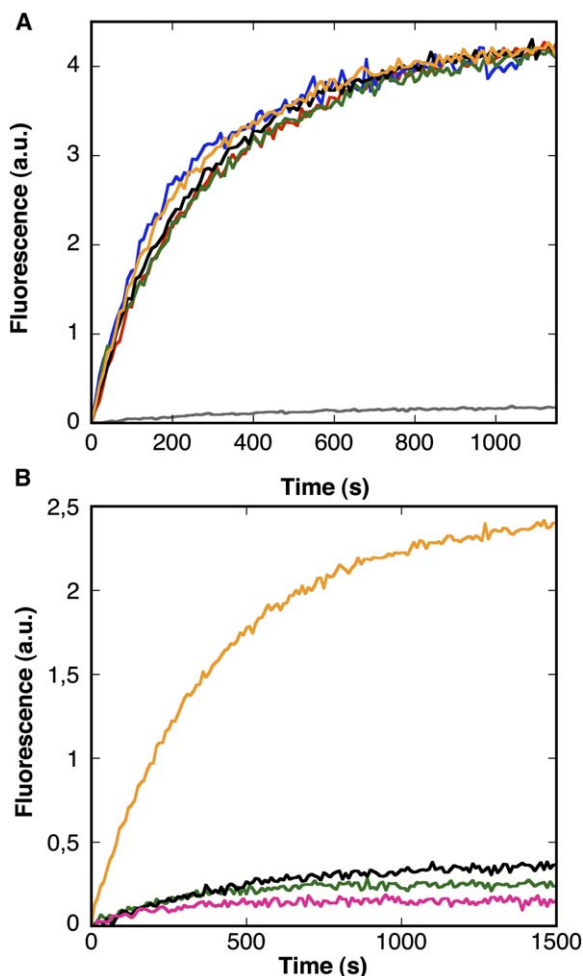


Figure S2. Effect of AFH1 at the Barbed or Pointed Ends of Actin Filaments

(A) Dependence of pointed-end capping on the concentration of AFH1. Freshly prepared seeds, consisting of short actin filaments capped on their barbed ends with gelsolin and comprising 3.3 nM of free pointed ends, were incubated with a range of concentrations of AFH1 for 5 min. The time course of elongation was recorded after addition of 1  $\mu$ M of 10% pyrene-labeled actin monomers. No significant effect of AFH1 was observed on the rate of elongation at the pointed ends in the presence of increasing concentrations of AFH1. No significant effect of AFH1 was observed on the rate of elongation at the pointed ends in the presence of increasing concentrations of AFH1 (red curve), 20 nM AFH1 (blue curve), 50 nM AFH1 (green curve), 100 nM AFH1 (black curve), or 300 nM AFH1 (orange curve). Addition of 2  $\mu$ M profilin completely blocks pointed-end elongation in the same assay (gray curve).

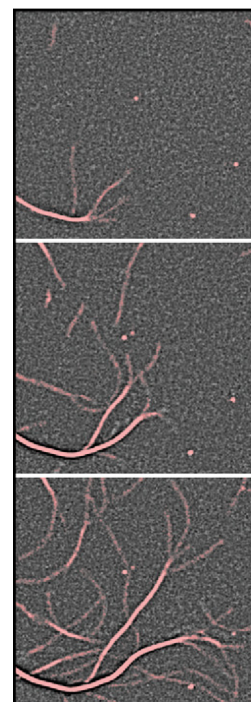
(B) AFH1 does not compete with *Arabidopsis* capping protein for barbed-end capping. Freshly prepared seeds, consisting of short actin filaments capped on their barbed ends with 75 nM of AtCP, were incubated with a range of concentrations of AFH1 for 5 min. The time course of elongation was recorded after adding 0.8  $\mu$ M of 10% labeled actin monomers in presence of 1.6  $\mu$ M profilin. No significant effect of AFH1 was observed on the rate of elongation at the barbed end capped with AtCP in the presence of increasing concentrations of AFH1, no AFH1 (green curve), 25 nM AFH1 (black curve), 75 nM AFH1 (pink curve), or uncapped seeds (orange curve).

#### Supplemental References

- S1. Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866–4871.
- S2. MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* 20, 329–341.
- S3. Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.* 114, 33–38.
- S4. Pollard, T.D. (1984). Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* 99, 769–777.
- S5. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437–11444.
- S6. Fedorov, A.A., Pollard, T.D., and Almo, S.C. (1994). Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 241, 480–482.
- S7. Huang, S., Robinson, R.C., Gao, L.Y., Matsumoto, T., Brunet, A., Blanchoin, L., and Staiger, C.J. (2005). *Arabidopsis* VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *Plant Cell* 17, 486–501.
- S8. Huang, S., Blanchoin, L., Kovar, D.R., and Staiger, C.J. (2003). *Arabidopsis* capping protein (Atcp) is a heterodimer that regulates assembly at the barbed ends of actin filaments. *J. Biol. Chem.* 278, 44832–44842.
- S9. Michelot, A., Guerin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2005). The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of *Arabidopsis* FORMIN1. *Plant Cell* 17, 2296–2313.
- S10. Harris, E.S., Li, F., and Higgs, H.N. (2004). The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* 279, 20076–20087.
- S11. Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., and Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2122–2127.
- S12. Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* 124, 423–435.
- S13. Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 15009–15013.
- S14. Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
- S15. Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (1999). Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 32531–32534.

## Formin Starts Filament Formation, Then Steps Aside

Actin filaments are a key construction material for the cell's cytoskeleton. Indeed, the dynamic growth and reorganization of actin filaments underlie numerous biological events from cell division to cell migration. Using a technique called total-internal-reflection fluorescence microscopy (TIRFM), Michelot et al. (2006) now report the effect of a formin protein AFH1 from the plant *Arabidopsis* on the formation of actin filaments. TIRFM detects fluorophores with exquisite sensitivity but only those near the interface of biological samples with glass or other materials of similar refractive qualities such that an evanescent field can be generated. Because of the limited depth that can be probed by this technique, it was first used to study processes at the plasma membrane, such as vesicle fusion. Michelot et al. now adapt TIRFM to detect individual actin-nucleating events (that is, the formation of individual actin filaments). These experiments were conducted in an in vitro system reduced to three simple components: actin monomers, formin, and profilin (which promotes the addition of actin monomers to the barbed ends of filaments). With AFH1 attached to the glass slide, actin filaments could be observed growing away from sites of nucleation. This finding indicated that AFH1 is nonprocessive, that is, AFH1 moves to the side of the growing filament following initiation of actin nucleation. In contrast, previous work indicated that following nucleation, other known formins become associated with the barbed ends of actin filaments, where it promotes filament elongation. Michelot and colleagues also show that AFH1 becomes attached to the side of pre-existing actin filaments and then nucleates new filament formation. In addition, AFH1 is able to promote the subsequent assembly of actin filaments into longitudinal bundles. This work provides a clear example of how TIRFM can be used to understand the regulation of actin dynamics. A. Michelot et al. (2006). *Curr. Biol.* **16**, 1924–1930.



The nonprocessive formin AFH1 initiates actin filament bundles as visualized by TIRFM. Image courtesy of L. Blanchoin.

Robert P. Kruger



***Article 3 : Dynamique Stochastique de filaments d'actine individuels induite par l'ADF/cofiline.***

**Alphée Michelot\*, Julien Berro\*, Christophe Guérin, Rajaa Boujemaa-Paterski, Christopher J. Staiger, Jean-Louis Martiel\*, et Laurent Blanchoin\*.**

\* co-premiers auteurs

+ co-correspondants

**Résumé :**

Le phénomène d'assemblage/désassemblage rapide des filaments d'actine (appelé dynamique de l'actine) est un mécanisme fondamental dans la plupart des processus cellulaires des organismes eucaryotes. De nombreux travaux au cours de ces 20 dernières années ont permis de caractériser un ensemble de protéines capable de contrôler cette dynamique (Pollard et al., 2000). Parmi ce grand nombre de protéines interagissant avec l'actine, la mise au point de systèmes biomimétiques capables de reproduire dans un milieu parfaitement contrôlé le mouvement de billes par polymérisation de l'actine a permis d'identifier un nombre minimum de protéines capables de reproduire la dynamique d'assemblage/désassemblage *in vitro* (Loisel et al., 1999). Les protéines nécessaires et suffisantes à cette dynamique rapide des filaments d'actine sont : 1/ les facteurs de nucléation de l'actine qui permettent de former de nouvelles extrémités barbées libres de s'allonger ; 2/ les protéines de coiffe qui contrôlent le nombre d'extrémité barbées et empêchent la déplétion du réservoir d'actine monomérique ; 3/ l'ADF/cofiline qui accélère le désassemblage des filaments d'actine ; 4/ la profiline qui accélère le renouvellement du nucléotide ADP en nucléotide ATP (Pollard et al., 2000). Cependant, si l'effet global de ces différentes protéines est relativement bien connu sur le cytosquelette, le mécanisme respectif de ces protéines à l'échelle moléculaire reste largement incompris. En particulier, le mécanisme de l'ADF/cofiline, qui a pourtant fait l'objet de nombreuses études, fait régulièrement l'objet de controverses (Ono, 2007). Alors que certaines études présentent le mécanisme de désassemblage des filaments d'actine par l'ADF/cofiline comme une accélération de 25 fois de la dépolymérisation des extrémités pointues des filaments d'actine (Carlier et al., 1997), d'autres études suggèrent au contraire que l'ADF/cofiline n'accélère le désassemblage

des filaments d'actine que par un mécanisme de fragmentations successives des filaments (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Dans tous les cas, toutes les études réalisées jusqu'à présent concernent le mécanisme de l'ADF/cofiline vis-à-vis de filaments avec majoritairement un ADP lié à chaque sous-unité, mais aucune de ces études n'a pris en compte l'importance de l'état du nucléotide pour la régulation du désassemblage des filaments d'actine. De plus, peu d'études jusqu'à présent se sont intéressées à l'activité de l'ADF/cofiline vis-à-vis de structures plus complexes de filaments d'actine telles que les câbles de filaments.

Ce travail utilise la technique originale de microscopie à onde évanescente pour observer en temps réel la dynamique d'assemblage et de désassemblage de filaments d'actine individuels ou organisés en structures plus complexes (Michelot et al., 2006). Nous avons utilisé un système biomimétique inspiré de l'essai de motilité reconstitué (Loisel et al., 1999), (Romero et al., 2004). Des billes de polystyrène sur lesquelles sont greffés des facteurs de nucléation processifs (ie. la formine mDia1) peuvent, en présence d'actine, de profiline et d'ADF/cofiline former autour d'elles des câbles d'actine suffisamment puissants pour propulser la bille dans le milieu (Romero et al., 2004). La force motrice responsable du mouvement des billes vient de la polymérisation de l'actine à la surface des billes, qui se fait par l'insertion de sous-unités d'actine entre l'extrémité barbée du filament et la formine. Dans notre nouveau système, en microscopie à onde évanescente, les billes sont fixées sur la lame pour pouvoir observer la polymérisation dans la limite du champ évanescent (environ 200 nm de profondeur). Cependant, la fixation des billes sur la lame n'est pas une contrainte pour l'analyse des forces induites par polymérisation de l'actine. En effet, la formation de câbles reste possible autour des billes, et dès que ces câbles deviennent suffisamment épais, la force qu'ils génèrent permet non plus de déplacer la bille, mais se transfère à leur structure pour provoquer leur flambage. Nous avons adapté les concentrations d'actine et la densité de formine à la surface des billes pour rendre possible en microscopie à onde évanescente l'observation des propriétés dynamiques de l'actine à l'échelle du filament individuel, en présence ou en absence des autres protéines nécessaires à la motilité efficace du système (ie. la profiline et l'ADF/cofiline).

Tout d'abord, en l'absence de profiline et d'ADF/cofiline, nous avons été capables d'observer la polymérisation de filaments d'actine de manière localisée à la surface des billes. Nous avons démontré que la polymérisation des filaments au contact de la bille se fait de manière processive. En effet, les filaments d'actine qui s'allongent depuis la bille forment des boucles caractéristiques quand les filaments viennent adhérer de façon non-spécifique avec la lame (Kovar and Pollard, 2004), et l'utilisation de l'actine marquée au fluorophore Alexa 532 (qui possède des propriétés de photoblanchiment rapide) révèle que l'insertion des sous-unités d'actine se fait au contact de la bille (Michelot et al.,

2006). Ces résultats répondent ainsi à la controverse posant la question de la nécessité ou non de la profiline pour permettre la processivité de la formine mDia1 (Romero et al., 2004), (Kovar et al., 2006), (Romero et al., 2007). En l'absence de profiline, la vitesse d'élongation des filaments d'actine nucléés par mDia1 et polymérisant contre la bille est voisine de la vitesse d'élongation des filaments polymérisant libres en solution ( $k_+ \approx 7.8 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ). En revanche, la présence de profiline permet l'accélération de la vitesse de l'élongation des filaments comme reporté précédemment par d'autres études faites sur le sujet ( $k_+ \approx 38 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  ; (Romero et al., 2004), (Kovar et al., 2006)). Nous avons fait varier la concentration de formine à la surface des billes, et obtenu une relation linéaire entre la concentration de formine utilisée pendant le greffage des billes et le nombre de filaments observés à la surface des billes en microscopie. La polymérisation de l'actine à la surface des billes entraîne rapidement la formation d'une pelote de filaments autour de la bille (voir Figure 39, étape 3), où l'insertion de sous-unités se fait très rapidement à l'extrémité barbée du filament au contact de la bille, alors que la dépolymérisation à l'extrémité pointue libre est presque indétectable à la résolution de l'expérience, même sur des dizaines de minutes. La longueur des filaments croît donc linéairement sur le temps de l'expérience. L'ajout d'ADF/cofiline dans cette expérience modifie dramatiquement le comportement des filaments d'actine. L'insertion des sous-unités d'actine se fait toujours aussi rapidement à l'extrémité barbée des filaments de façon processive, mais la région du filament d'actine à proximité de l'extrémité pointue est fragmentée (voir Figure 39, étape 2'), aboutissant au bout de quelques minutes à l'établissement d'une dynamique stochastique du filament d'actine lui imposant des fluctuations de longueur autour d'une longueur moyenne constante. Le désassemblage des filaments d'actine se fait donc dans nos expériences majoritairement par un processus de fragmentation comme cela est suggéré par plusieurs travaux antérieurs ((Maciver et al., 1991a); (Blanchoin and Pollard, 1999), (Andrianantoandro and Pollard, 2006), (Pavlov et al., 2007)). Ces expériences représentent une avancée majeure, car pour la première fois, il a été possible de reproduire et d'observer directement *in vitro* la dynamique de filaments individuels, à une vitesse 155 fois plus rapide que le *turnover* simple d'un filament d'actine. Cette vitesse est maintenant en accord avec la vitesse de *turnover* des filaments d'actine *in vivo* (Wang, 1985), (Theriot and Mitchison, 1991).

Afin de comprendre le mécanisme contrôlant la vitesse de fragmentation des filaments et permettant d'obtenir des filaments de longueur moyenne constante, nous avons couplé cette étude avec une modélisation *in silico* des expériences. Cette modélisation, réalisée par l'équipe de Jean-Louis Martiel avec qui nous avons travaillé en proche collaboration, représente les filaments d'actine de façon dynamique autour de la bille. Ce modèle tient compte des interactions moléculaires entre les différentes protéines

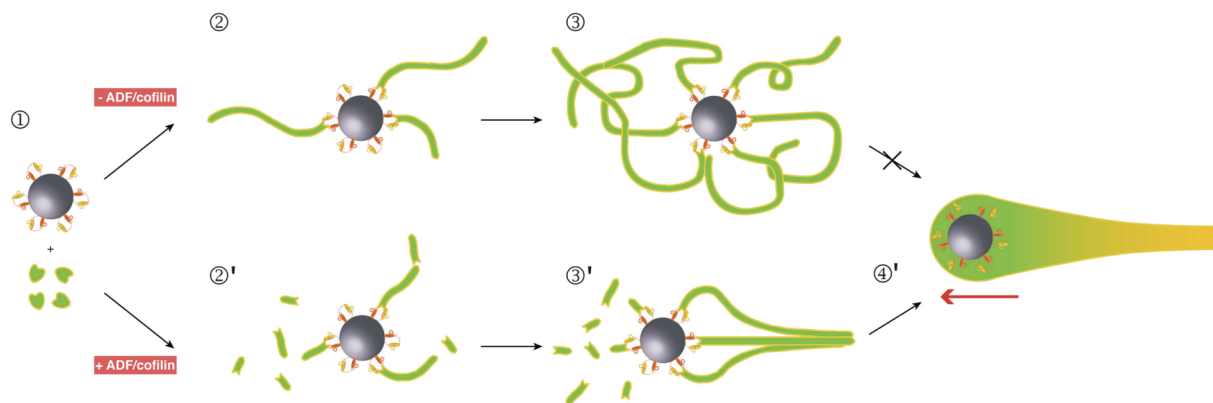


et intègre aussi toutes les constantes cinétiques du système, notamment toutes les constantes cinétiques concernant les effets de l'ADF/cofiline sur la dynamique de l'actine. Dans ces conditions, le modèle *in silico* est très cohérent avec les données obtenues *in vitro*, et montre clairement que la fragmentation des filaments d'actine est limitée uniquement par la présence de sous-unités ATP ou ADP-Pi dans le filament. Ainsi, l'ADF/cofiline est capable de fragmenter les filaments d'actine à proximité de l'extrémité pointue qui correspond à l'extrémité la plus « ancienne » du filament, alors que les sous-unités proches de l'extrémité barbée qui se trouvent encore majoritairement dans un état ATP ou ADP-Pi sont protégées de la fixation de l'ADF/cofiline. Nous avons confirmé ce résultat en réalisant l'expérience de polymérisation de l'actine autour des billes mDia1 en présence d'ADF/cofiline et de  $\text{BeF}_3$ . Le  $\text{BeF}_3$  se lie trois fois plus fortement que le phosphate sur les filaments d'actine ADP (Combeau and Carlier, 1988) qui prennent alors la conformation de filaments ADP-Pi. La présence de  $\text{BeF}_3$  empêche donc la fixation de l'ADF/cofiline (Blanchoin and Pollard, 1999), et aucun évènement de fragmentation par l'ADF/cofiline n'est observé.

Nous avons pu mettre en évidence dans ces expériences que les filaments d'actine associés en câbles sont protégés du désassemblage par l'ADF/cofiline. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, il est probable que l'association des filaments sous forme de câbles les protège vis-à-vis des fluctuations thermiques. Ainsi, suite à une fragmentation par l'ADF/cofiline, le fragment d'actine généré n'a à priori aucune raison de se séparer du câble, et la coupure ne se voit pas. En étant maintenu dans le câble, le fragment peut éventuellement même par la suite se réassocier avec un filament du câble, annulant ainsi l'effet de l'ADF/cofiline. L'interaction de l'ADF/cofiline avec les filaments d'actine est un phénomène coopératif lent (Ressad et al., 1998). Une hypothèse pouvant expliquer cette constante de vitesse d'association lente est que l'ADF/cofiline se fixe en des points de faiblesse le long du filament d'actine probablement créés suite à des fluctuations longitudinales de torsion (De La Cruz, 2005). Une stabilisation des filaments d'actine par contacts latéraux dans les câbles limiterait ces fluctuations et rendrait moins probable la fixation de l'ADF/cofiline, stabilisant ainsi les filaments d'actine à l'intérieur du câble.

Nous proposons enfin que ce processus de sélection réalisé indirectement par l'ADF/cofiline, favorisant la formation de câbles épais aux dépens des structures de filaments moins rigides, puisse expliquer la brisure de symétrie dans les essais de motilité avec la formine comme facteur de nucléation. En utilisant un jeu de concentration adéquat de protéines, nous avons été capable d'observer en temps réel en microscopie à onde évanescence toutes les étapes de la brisure de symétrie autour des billes, depuis la formation des premiers filaments d'actine autour des billes jusqu'à la formation de câbles épais stables capables d'exercer des forces sur les billes. Dans un

premier temps, le greffage uniforme de mDia1 autour des billes (voir Figure 39, étape 1) induit la formation d'un nuage isotrope de filaments individuels. Rapidement, l'ADF/cofiline commence à désassembler par fragmentation ces filaments d'actine (voir Figure 39, étape 2'). Au bout de 15 min, les premières interactions latérales stables entre filaments proches commencent à se produire (voir Figure 39, étape 3'). Ces quelques câbles d'actine nouvellement formés sont plus résistants à l'action de l'ADF/cofiline, et se renforcent progressivement avec les filaments d'actine voisins, pendant que les filaments seuls continuent à se désassembler au même rythme. Au bout de 60 min, les câbles d'actine deviennent les structures d'actine majoritaires autour des billes (voir Figure 39, étape 4'). La symétrie est alors brisée, et les câbles sont devenus suffisamment puissants pour pousser sur la bille ou engendrer le flambage des câbles. Ce processus de sélection décrit est potentiellement un mécanisme simple pour initier un grand nombre de structures organisées de filaments d'actine telles que les fibres de stress.



**Figure 39 : Modèle montrant l'influence de l'ADF/cofiline pour l'accélération du turnover des filaments d'actine, la stabilisation des câbles et la brisure de symétrie.** Le greffage de la formine mDia1 permet *in vitro* la nucléation localisée de filaments d'actine ayant leurs extrémités barbées au contact de la bille (étape 1). En l'absence d'ADF/cofiline, l'élongation des filaments au contact de la bille conduit progressivement à la formation de nuages denses d'actine (étapes 2 et 3). La présence d'ADF/cofiline entraîne la fragmentation progressive des filaments âgés (riches en sous-unités ADP) à proximité des extrémités pointues, augmentant ainsi leur vitesse de turnover (étape 2'). L'association des filaments en câbles les stabilise et limite l'action de l'ADF/cofiline (étape 3').



# **ARTICLE 3**



# Actin-Filament Stochastic Dynamics Mediated by ADF/Cofilin

Alphée Michelot,<sup>1,5</sup> Julien Berro,<sup>2,5</sup>  
Christophe Guérin,<sup>1</sup> Rajaa Boujemaa-Paterski,<sup>1</sup>  
Christopher J. Staiger,<sup>3,4</sup> Jean-Louis Martiel,<sup>2,\*</sup>  
and Laurent Blanchoin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches en Technologie et Sciences  
pour le Vivant

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale  
CEA Grenoble

Commissariat à l'Energie Atomique  
Centre National de la Recherche Scientifique  
Institut National de la Recherche Agronomique  
Université Joseph Fourier  
17 rue des Martyrs  
F38054 Grenoble  
France

<sup>2</sup>Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale  
et de la Complexité  
Centre National de la Recherche Scientifique 5525  
Pavillon Taillefer  
Faculté de Médecine  
F-38706 La Tronche  
France

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences and

<sup>4</sup>The Bindley Bioscience Center  
Purdue University  
West Lafayette, Indiana 47907-2064

## Summary

**Background:** The rapid dynamics of actin filaments is a fundamental process that powers a large number of cellular functions. However, the basic mechanisms that control and coordinate such dynamics remain a central question in cell biology. To reach beyond simply defining the inventory of molecules that control actin dynamics and to understand how these proteins act synergistically to modulate filament turnover, we combined evanescent-wave microscopy with a biomimetic system and followed the behavior of single actin filaments in the presence of a physiologically relevant mixture of accessory proteins. This approach allows for the real-time visualization of actin polymerization and age-dependent filament severing.

**Results:** In the presence of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin and profilin, actin filaments with a processive formin attached at their barbed ends were observed to oscillate between stochastic growth and shrinkage phases. Fragmentation of continuously growing actin filaments by ADF/cofilin is the key mechanism modulating the prominent and frequent shortening events. The net effect of continuous actin polymerization, driven by a processive formin that uses profilin-actin, and of

ADF/cofilin-mediated severing that trims the aged ends of the growing filaments is an up to 155-fold increase in the rate of actin-filament turnover in vitro in comparison to that of actin alone. Lateral contact between actin filaments dampens the dynamics and favors actin-cable formation. A kinetic simulation accurately validates these observations.

**Conclusions:** Our proposed mechanism for the control of actin dynamics is dominated by ADF/cofilin-mediated filament severing that induces a stochastic behavior upon individual actin filaments. When combined with a selection process that stabilizes filaments in bundles, this mechanism could account for the emergence and extension of actin-based structures in cells.

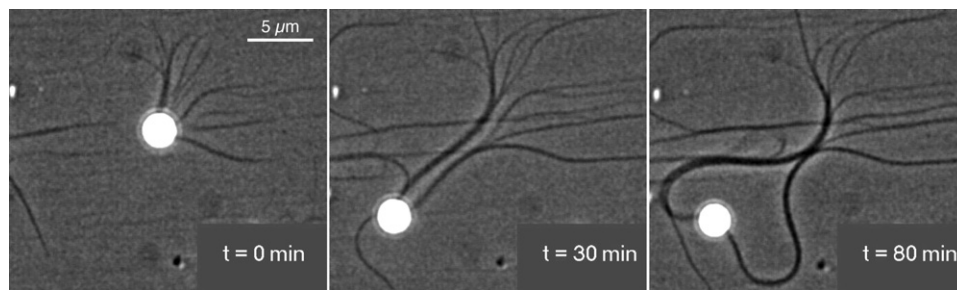
## Introduction

Force generation lies at the heart of a large and diverse array of cellular processes, including morphogenesis, the establishment of polarity, and motility [1]. The actin cytoskeleton can produce these large forces directly based on three main properties: (1) the abundance of the major protein constituent, actin; (2) the potential to modulate polymerization and depolymerization with a battery of accessory proteins; and (3) the ability to self-organize into higher-order structures [2]. The basic unit in this system is monomeric actin, a 42 kDa protein that binds a nucleotide (ATP) and a divalent cation ( $Mg^{2+}$ ). In vivo, MgATP-actin monomers assemble rapidly into polarized helical filaments that are a few microns in length and that make contacts with the plasma membrane to drive cell movement at rates of up to 10  $\mu m/min$  [1]. To sustain movement over time and to be able to rapidly change the direction of movement in response to stimuli, locomoting cells need to continuously polymerize actin filaments at the leading edge and disassemble actin filaments at the rear of the lamellipodium. This fast actin-filament turnover has been established for several different cells, including fibroblasts [3], fish keratocytes [4], and neuronal growth cones [5]. Moreover, dynamic actin polymerization and depolymerization contribute to the formation of different actin-based structures, such as filopodia and microspikes [6], as well as yeast actin cables and patches [7]. However, the basic mechanisms underlying fast actin-filament turnover in vivo remain a central unanswered question in cell biology. Indeed, actin filaments in vitro are stable structures that turn over at rather slow rates by a mechanism called “treadmilling.” At steady state, treadmilling comprises the addition of actin monomers at filament barbed ends and the accompanying depolymerization of actin subunits at filament pointed ends (rate of 0.27  $s^{-1}$  [8]). This is two orders of magnitude too slow for it to be compatible with cell locomotion [9].

Biomimetic systems that reconstitute actin-based motility in vitro are a valuable tool for identifying the minimum set of actin-binding proteins required for generating propulsion forces [10]. Here we use a combination of

\*Correspondence: [jean-louis.martiel@imag.fr](mailto:jean-louis.martiel@imag.fr) (J.-L.M.), [laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr) (L.B.)

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work.



**Figure 1. Motility of Polystyrene Beads Coated with the Formin mDia1 in a Biomimetic Reconstituted System**

Conditions: mDia1-coated beads (1  $\mu\text{M}$ ) were added to a motility medium containing 8  $\mu\text{M}$  F-actin, 4  $\mu\text{M}$  profilin, and 10  $\mu\text{M}$  human cofilin. Images were taken at the indicated times during polymerization.

Time-lapse images of motile mDia1 beads were acquired by phase-contrast microscopy. After a few minutes, actin-filament cables appeared and managed to propel the bead, in this representative example. If any obstacle stopped the bead, the force from actin polymerization buckled the actin cables instead of pushing the bead ( $t = 80$  min). See also [Movie S1](#). The scale bar represents 5  $\mu\text{m}$ .

such a system and total-internal-reflection fluorescence microscopy (TIRFM), which allows for the direct visualization of single actin filaments and the characterization of the molecular mechanism underlying physiological actin-filament turnover. In this system, individual actin filaments attached to a polystyrene bead with a processive formin revealed a highly dynamic behavior in which continuous growth alternates with catastrophic reductions in overall filament length. We find that the severing activity of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin plays a central role in this stochastic actin-filament-length oscillation by trimming the aged end of a filament that continues to grow at the barbed end. Lateral interactions between actin filaments modulate filament stability and are essential for actin-cable formation and bead motility. Based on experimental parameters, we have developed a kinetic model that validates our observations.

## Results

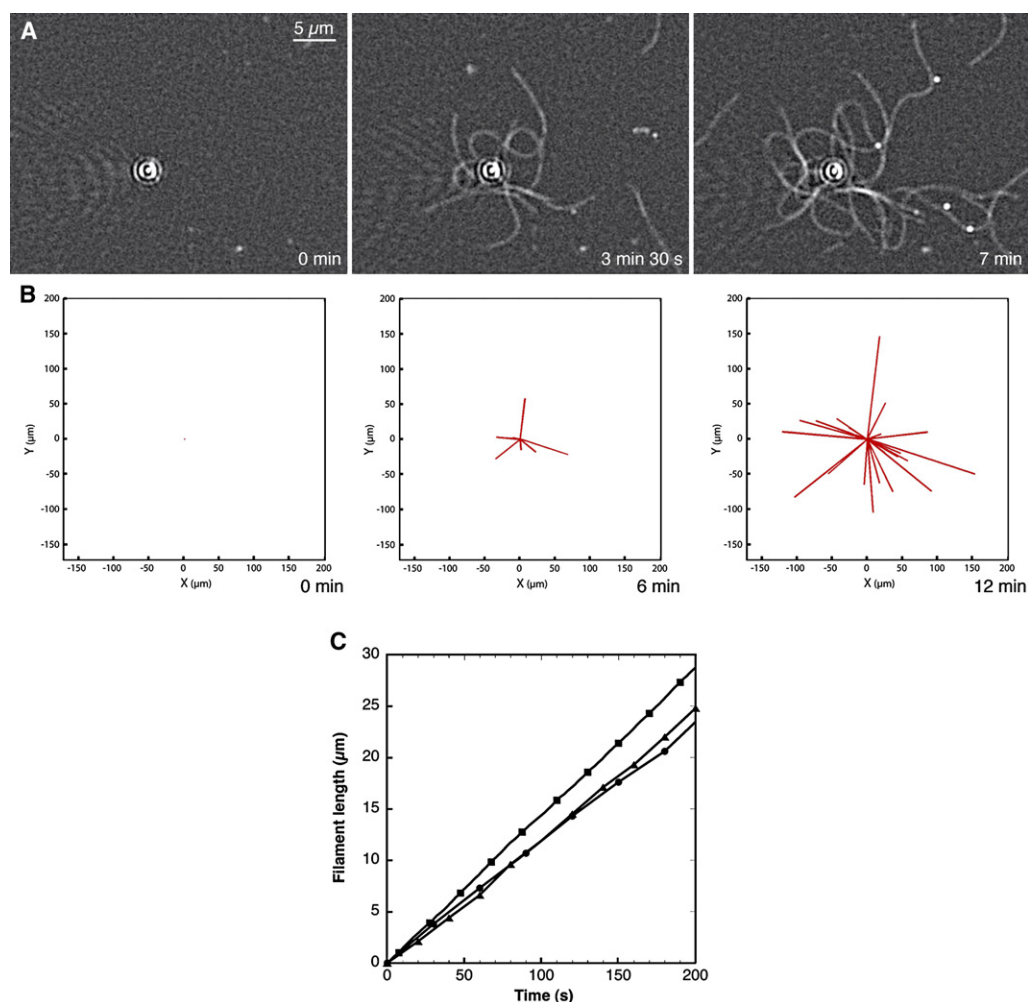
### Actin Polymerization at the Surface of Formin-Coated Beads Generates Motility

Polystyrene beads coated with the actin-promoting factor of formin, mDia1 FH1-FH2, were added to a mixture of purified proteins, including actin filaments, profilin, and ADF/cofilin. Actin polymerization was initiated from their surface, and ultimately bead movement could be observed at a velocity of  $0.2 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$  by phase-contrast microscopy ([Figure 1](#) and [\[11\]](#)). A “tail” of actin filaments attached to the bead comprises two large actin-filament bundles that are arrayed at  $180^\circ$  from each other ([Figure 1](#); [Movie S1](#) in the [Supplemental Data](#) available online). We hypothesize that movement reflects the continuous insertional polymerization of actin filaments due to a processive nucleation–elongation factor (i.e., the formin mDia1) at the surface of the bead and the actin-filament shortening induced by ADF/cofilin. When the bead stops moving, due to nonspecific interactions with other filament bundles in the mixture or with the cover glass, actin polymerization continues and is powerful enough to buckle actin-filament bundles ([Figure 1](#),  $t = 80$  min; [Movie S1](#)). Such buckling events have also been observed for individual actin filaments constrained in space by mDia1 attached to the growing barbed ends and by NEM-myosin II attached to the filament side [\[12, 13\]](#).

### Direct Visualization of Individual Actin-Filament Polymerization at the Surface of mDia1-FH1-FH2-Coated Beads

We used TIRFM to follow the nucleation and polymerization of single actin filaments at the surface of beads coated with mDia1 FH1-FH2 ([Figure 2A](#); [Movies S2–S6](#)). An advantage of our experimental design compared to those of previous TIRFM experiments with formins is that we know the exact location of mDia1 (i.e., at the bead surface). We introduced mDia1-coated beads into a TIRFM flow chamber and initiated polymerization by adding rhodamine- or Alexa-532-labeled actin monomers, initially in the presence of an excess of profilin ([Figure 2A](#); [Movies S2–S4](#)). A few seconds after the addition of profilin-actin, actin filaments nucleated from the surface of the bead by mDia1 grew continuously at a rate of up to  $k_+ = 38 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ([Figures 2A](#) and [2C](#); [Movies S2–S4](#)), in agreement with previous reports [\[13, 14\]](#). We were able to modulate the density of actin filaments generated at the surface of the beads by varying the concentration of attached formins (compare [Movies S2](#) and [S3](#)). We obtained a linear correlation between the concentration of attached mDia1 and the efficiency of actin-filament nucleation from the beads (data not shown).

We recently established that Alexa-532 actin is a useful tool for identifying and following polymerization at the growing barbed end of actin filaments [\[13\]](#). The intensity of Alexa-532-actin-filament fluorescence decreases rapidly as a result of photobleaching, with the result that subunits near the growing barbed ends are substantially brighter than older parts of the filament [\[13\]](#). This decrease is not related to the loss of fluorescence when an actin filament moves out of the evanescent wave; indeed, comparable bleaching is not observed with rhodamine-labeled actin. By using Alexa-532 actin, we demonstrated here that mDia1 attached to the beads is processive ([Movie S4](#)). The brightest part of an actin filament, corresponding to the growing barbed end, was always in contact with the formin attached to the beads (green arrows, [Movie S4](#)), whereas fluorescence of the actin filament near the pointed end decreased markedly over time (blue arrows, [Movie S4](#)). When actin filaments that initiated at the bead surface came into contact with the glass slide, we often observed buckling events, consistent with the processive behavior of mDia1 ([Figure 2A](#); [Movies S2–S4](#)).



**Figure 2. TIRF Microscopy is a Powerful Tool for the Visualization of Individual Actin Filaments Polymerizing at the Surface of mDia1-Coated Beads**

Conditions: mDia1-coated beads (100 nM) were attached to the cover glass before the addition of 1.2  $\mu\text{M}$  rhodamine-labeled actin monomers in the presence of 3.6  $\mu\text{M}$  profilin.

(A) Time-lapse evanescent-wave microscopy of rhodamine-labeled-actin polymerization around 100 nM mDia1-coated beads (corresponding to 12 molecules of active mDia1 per  $\mu\text{m}^2$ , on average). Almost all filaments were nucleated from the beads and remained attached while elongating. Actin filaments under these conditions grew at a rate of  $k_+ = 38 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Moreover, filaments nucleated from the beads often buckled, as expected for a processive elongation factor. See also [Movie S2](#).

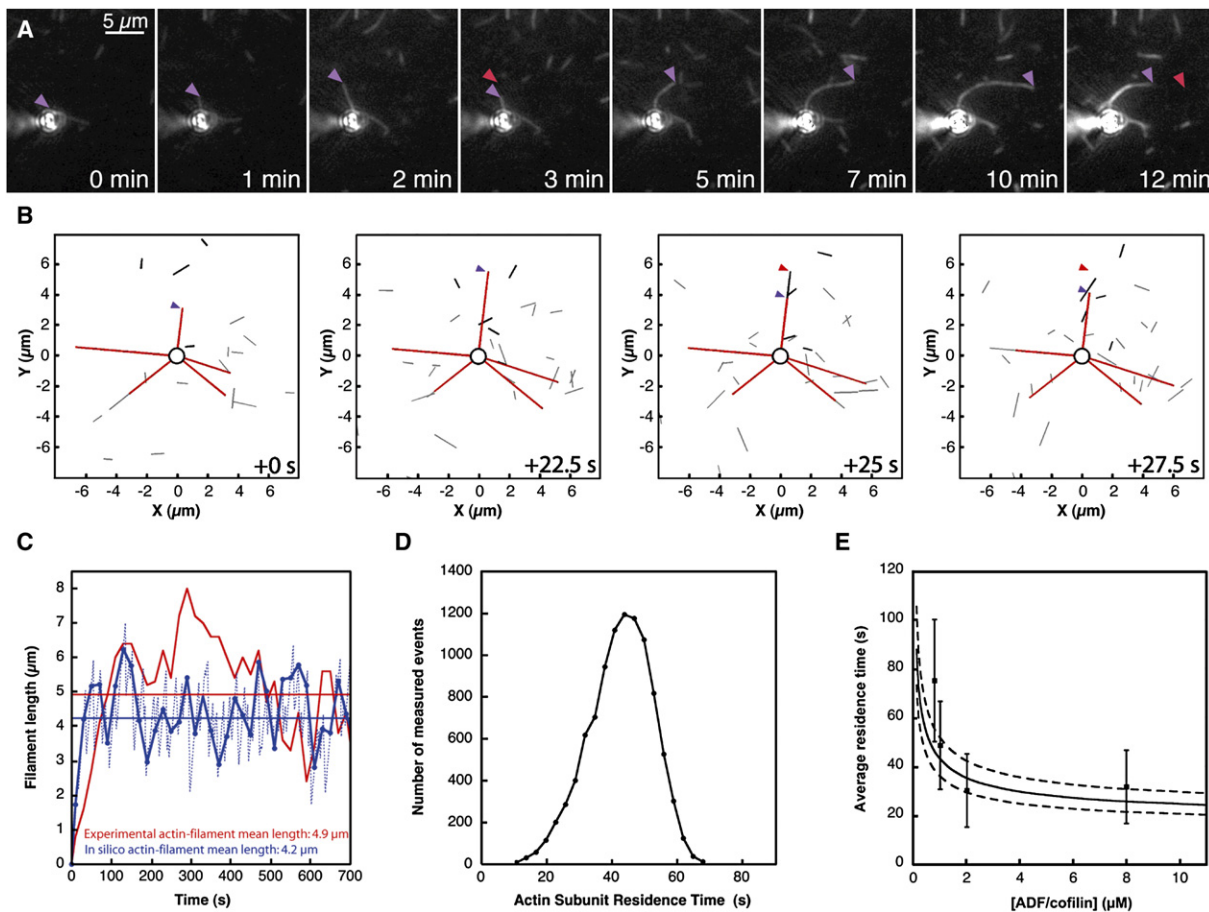
(B) In silico modeling of the polymerization of 1.2  $\mu\text{M}$  actin around 100 nM mDia1-coated beads. Actin filaments are represented as red sticks centered on the central position where the bead remains. Actin filaments elongated progressively as long as polymerization occurred. See also [Movie S7](#).

(C) The length of an actin filament over time as monitored by TIRFM, for a rhodamine labeled (circles) or an Alexa-532 labeled (triangles) filament, is compared with the in silico growth of an actin filament (squares). At this point in the experiment, filaments elongated linearly over time and grew at a fast rate (i.e.,  $38 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), consistent with the unique properties of mDia1 in the presence of profilin.

Whether profilin is necessary for the processive behavior of mDia1 remains controversial [11, 14]. However, we were able to induce growth of actin filaments, at a rate of  $k_+ = 7.8 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , from the surface of mDia1-coated beads in the absence of profilin ([Movies S5 and S6](#)). Moreover, the use of Alexa-532-actin allowed us to show that the growing barbed end was continuously attached to a formin at the surface of a bead (green arrow, [Movie S6](#)). These observations, and the fact that actin filaments initiated from the bead surface often buckle ([Movie S6](#)), demonstrate that profilin is not necessary for formin processivity and are in agreement with Kovar et al. [14].

To simulate the nucleation and growth of actin filaments during evanescent-wave-microscopy experiments, we developed a 2D kinetic model (see [Experimental Procedures](#) and [Figures S1 and S2](#)) that accounts for the full process of nucleation and processive elongation at the surface of a bead ([Figures 2B and 2C](#); [Movie S7](#)). The model addresses only the kinetics of filament growth; as a consequence, we neglected all filament-shape fluctuations (see [Supplemental Data](#) for a discussion of this hypothesis). The rate of elongation and the density of actin filaments generated at the surface of the beads agreed between experimental and simulated data ([Figure 2C](#)).





**Figure 3. A Reconstituted System with Formin, Profilin, and ADF/Cofilin Induces a Stochastic Behavior of Growing Actin Filaments and Accelerates Their Turnover**

Conditions: mDia1-coated beads (100 nM) were attached to the cover glass before the addition of 1.2  $\mu\text{M}$  rhodamine-labeled actin monomers in the presence of 3.6  $\mu\text{M}$  profilin and 1  $\mu\text{M}$  human cofilin. Purple arrows follow the actin-filament end during elongation, whereas the red arrows represent the last observed position of a filament end before shortening.

(A) Time-lapse evanescent-wave microscopy of rhodamine-labeled-actin polymerization around mDia1-coated beads in the presence of human cofilin and profilin. Human cofilin severed actin filaments while they elongated, thereby accelerating the turnover of actin subunits through the filament pool that remained attached to the beads. See also [Movie S8](#).

(B) In silico modeling of actin polymerization around 100 nM mDia1-coated beads in the presence of 1  $\mu\text{M}$  human cofilin and 3.6  $\mu\text{M}$  profilin. Red sticks representing actin filaments around mDia1-coated beads show a stochastic dynamic behavior due to the synergistic effects of formin, profilin, and ADF/cofilin. See also [Movie S10](#).

(C) Length fluctuations of an actin filament over time for experimental data (red curve) and for a representative example of in silico data (blue dotted curve). Blue dots represent the length of the in silico actin filament every 20 s (corresponding to the sampling time of the camera during TIRFM experiments). The theoretical blue curve links the blue dots and predicts the length variation that might be observed experimentally. Straight lines represent the average length both experimentally (red line) and in silico (blue line).

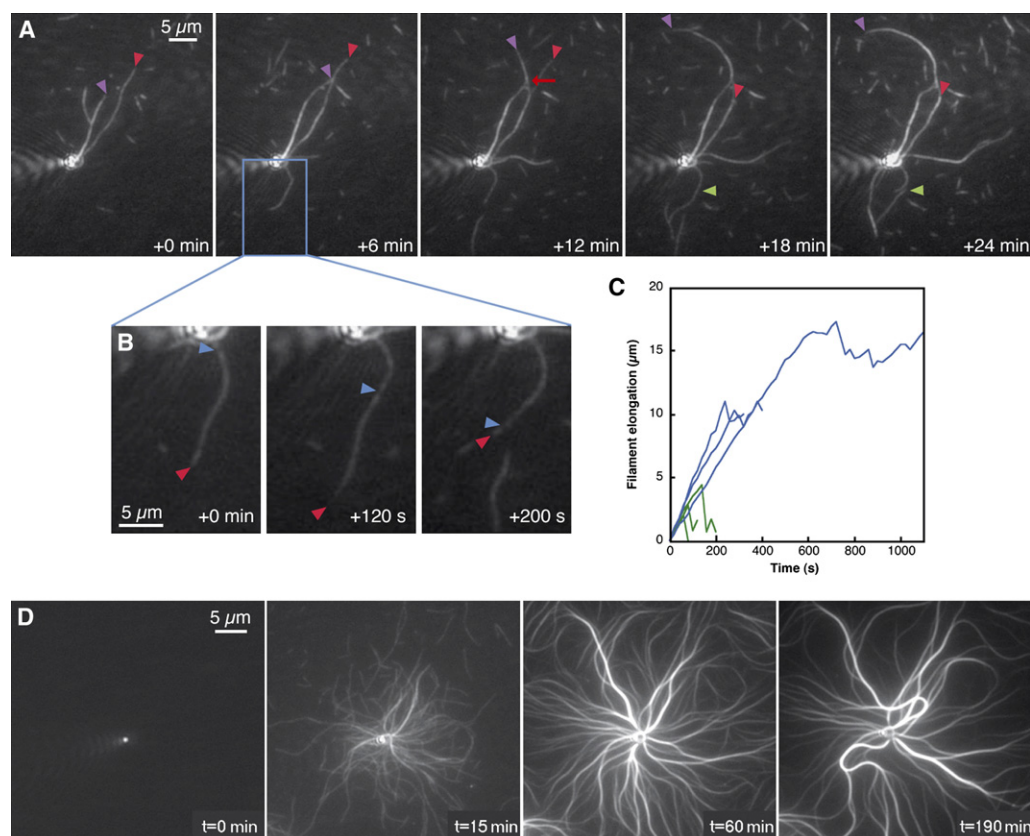
(D) Distribution of subunit residence time obtained from in silico reconstitution of actin-filament turnover in the presence of formin, profilin, and ADF/cofilin. The residence time peaks at approximately 43 s. (average  $\pm$  SD  $\sim 43 \pm 9.7$  s) and is limited either by the time delay for the  $P_i$  dissociation (distribution lower limit,  $\sim 10$  s) or by the binding of ADF/cofilin to the actin filament (distribution upper limit,  $\sim 65$  s). All actin subunits in a filament are replaced after a time interval of about 65 s, the maximal time residence obtained from simulations. See also [Movie S11](#).

(E) Average residence time of subunits in actin filaments in the presence of ADF/cofilin. Error bars represent variability in measurements. Both experiments (filled circles) and simulations (solid line) show that the subunit residence time is extremely sensitive to the presence of ADF/cofilin at a low concentration (below 1  $\mu\text{M}$ ). This residence time is bounded at high ADF/cofilin concentrations by a lower value, about 25 s. Simulations were carried out with the conditions of [Figure 3D](#) (dotted lines and vertical bars indicate the variance for simulated and experimental data, respectively).

### Synergistic Effects of Formin, Profilin, and ADF/Cofilin Induce Stochastic Growth and Shortening, Resulting in Rapid Turnover of Growing Actin Filaments

We next reconstituted single-actin-filament dynamics by introducing mDia1-coated beads into the flow chamber and then added rhodamine-actin monomers, profilin, and ADF/cofilin (Figures 3A and 4A; [Movies S8 and](#)

[S12](#)). A few seconds after the addition of the protein mixture, actin filaments were initiated at the surface of the bead ([Figure 3A](#)). Initially, these filaments grew continuously at a rate of up to  $38 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . However, after the initial period, these actin filaments were observed to switch rapidly between phases of elongation ([Figure 3A](#), purple triangle; [Movie S8](#)) and shortening ([Figure 3A](#), red triangle; [Movie S8](#)). This is remarkable because until



**Figure 4. TIRF Microscopy Allows for the Visualization of Actin-Filament-Cable Formation and Explains the Symmetry Breaking in a mDia1-Based Motility Assay**

Conditions: mDia1-coated beads were attached to the cover glass before the addition of  $1.2 \mu\text{M}$  rhodamine-labeled actin monomers in the presence of  $3.6 \mu\text{M}$  profilin and variable amounts of human cofilin.

(A) Time-lapse evanescent-wave microscopy of rhodamine-labeled-actin polymerization around a  $100 \text{ nM}$  mDia1-coated bead in the presence of  $1 \mu\text{M}$  human cofilin and  $3.6 \mu\text{M}$  profilin. Human cofilin efficiently severed (green triangle) and reduced the length of single actin filaments while they elongated (red triangle), whereas zippering of actin filaments (red arrow) generated thicker actin-filament cables that were more resistant to ADF/cofilin (purple triangle). See also [Movie S12](#).

(B) Speckles inside the growing filaments (blue triangle) allowed us to demonstrate that during shortening phases (red triangle tracks the pointed end of an actin filament) the addition of subunits at the barbed end continues at the same rate. See also [Movie S12](#). This figure represents an enlargement of the region defined by the blue box in (A).

(C) Length variation of a single filament before and after a zippering event. A typical zippering event is marked with the red arrow in (A). An actin filament after zippering is more resistant to ADF/cofilin fragmentation (blue curves) than an isolated actin filament (green curves). This is illustrated by the average length of isolated or zippered actin filaments.

(D) Time-lapse evanescent-wave microscopy of rhodamine-labeled-actin polymerization around a  $1 \mu\text{M}$  mDia1-coated bead in the presence of  $4 \mu\text{M}$  human cofilin and  $3.6 \mu\text{M}$  profilin. Human ADF/cofilin principally severed single actin filaments rather than actin cables, leading to the gradual symmetry breaking and formation of large actin cables after 1 hr. After 3 hr, continuous insertion of actin monomers between the barbed ends of actin filaments and formins attached to the bead produced enough force to buckle the cables. See also [Movie S13](#).

now, only minor catastrophes have been reported for single actin filaments [15]. The addition of  $\text{BeF}_3$ , which is a strong inhibitor of ADF/cofilin binding and mimics the  $\text{ADP-P}_i$  state of actin filaments [16], to the protein mixture prevents the stochastic behavior of actin filaments ([Movie S9](#)). ADF/cofilin contributes to the shortening of actin filaments by clipping off the aged ends of continuously growing actin filaments ([Figure 3A](#), [Movie S8](#); and [Figure 4A](#), [Movie S12](#), green arrows mark an example of severing). The apparent elongation rate of formin-bound actin filaments is then determined by the addition of actin monomers at the barbed end and massive subunit loss resulting from the severing of varying lengths of filament from the distal or pointed end. Speckles in the actin filament ([Figure 4B](#), blue triangle) confirm that, during a shortening phase

([Figure 4B](#), red triangle), the addition of actin monomers continues at the barbed end at a similar rate. This suggests that in the presence of formin, profilin, and ADF/cofilin the net polymerization at the growing barbed ends attached to a processive formin of 41.8 subunits per second is balanced by the subunit loss that results from ADF/cofilin trimming the aged end of the growing actin filament ([Figures 3A and 4A](#); [Movies S8 and S12](#)).

By incorporating into our kinetic model all reactions that contribute to the effects of ADF/cofilin on actin dynamics (these reactions include binding to actin monomers and filaments, fragmentation, depolymerization, and an increase in the rate of phosphate dissociation from actin filaments), we were able to reproduce the two phases (i.e., elongation and shortening) of single actin filaments at the surface of formin-coated beads

(Figure 3B; Movie S10). Similar to our experimental conclusions, the kinetic simulation suggests that fragmentation is the mechanism that counterbalances rapid actin-filament elongation in the presence of formin. Analysis of the variation in the length of actin filaments attached to the beads by a processive formin, both experimentally (Figures 3A and 3C, red curve) and *in silico* (Figures 3B and 3C, dashed blue curve), revealed that after a rapid phase of elongation (about 100 s), a single actin filament fluctuates rapidly between phases of elongation and shortening. To compare experimental and simulated data, we reduced the *in silico* number of time points for the acquisition of actin-filament length (Figure 3C, solid blue curve). We obtained similar profiles for the simulated and experimental dynamics of single actin filaments with close average lengths (Figure 3C, compare solid red and blue curves). These results suggest that the fluctuations in the length of actin filaments in our TIRFM experiment were probably underestimated because of the limit of resolution of the microscope system (i.e., 0.5  $\mu\text{m}$ ) and the time of acquisition between consecutive frames; this acquisition time might have allowed actin filaments to be severed and disappear from the evanescent field between frames. The kinetic simulation enabled us to predict that an actin subunit spends, in our experimental conditions (Figure 3A; Movie S8), on average, about 43 s on a growing actin filament before dissociation by severing (Figure 3D; Movie S11). Increasing the concentration of ADF/cofilin reduces this average time to a lower limit of 25 s, both experimentally and *in silico* (Figure 3E).

#### Bundling Stabilizes Actin Filaments and Prevents ADF/Cofilin Severing

Although ADF/cofilin severs single actin filaments quickly, we report here that higher-order structures such as actin bundles were more resistant to ADF/cofilin severing (Figures 4A and C; Movie S12). This is also observed for actin-filament bundles generated by villin, a crosslinking protein [17]. As the density of actin filaments increased around the polystyrene beads, individual actin filaments started to interact with each other through a “zippering” mechanism and generated actin-filament bundles (Figure 4A, red arrow, 6 min; Movie S12; and [13]). A comparison of the fluctuations in the length of a single actin filament alone before (Figure 4C, green curves) and after (Figure 4C, blue curves) a zippering event revealed an obvious increase in the persistence of the elongation because of bundle formation. This demonstrates that bundles were stabilized against fragmentation by ADF/cofilin, whereas surrounding single actin filaments attached to the beads were still continuously fragmented by ADF/cofilin (Figure 4A and Movie S12, green arrows).

#### Zippering of Actin Filaments Inhibits ADF/Cofilin Activity and Favors the Formation of Large Actin Cables Responsible for Actin-Based Motility

The combination of TIRFM and a biomimetic system of formin-coated polystyrene beads allowed us to determine the sequence of events leading from stationary to motile beads (Figure 4D). Because actin, profilin, and ADF/cofilin are the only proteins required in our motility assay, experiments were conducted with densely

coated beads (i.e., 1  $\mu\text{M}$  mDia) in the presence of rhodamine-actin, profilin, and human cofilin (Figure 4D; Movie S13). After the addition of the protein mixture into the flow cell, actin-filament polymerization began rapidly around the beads (Figure 4D, 0 to 15 min; Movie S13). Subsequently, it appeared that the dense mDia1 coating of the beads induced a saturation of the bead by actin filaments that contact each other because of thermal fluctuations and then zipper to form large actin-filament cables (Figure 4D, 15 to 60 min; Movie S13). Because actin-filament cables became progressively stiffer and brighter, we suggest that fragmentation by ADF/cofilin is less efficient on these structures (Figure 4D, 60 to 190 min; Movie S13). After 1 hr, large actin bundles were the predominant actin-based structures associated with the bead (Figure 4D; Movie S13). Two of these cables started to buckle at a rate of elongation of  $0.2 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$  (Figure 4D, 190 min; Movie S13), similar to that of the large actin cables observed during the motility of the mDia1 bead (Figure 1). No motility was observed in the TIRFM experiments, however, because the nonspecific interaction of the beads with the cover glass was required for maintaining the bead in the field of the evanescent wave. In the absence of ADF/cofilin, actin-filament bundles were organized randomly around the beads (Movie S14).

We propose that, in the case of mDia1-coated beads, the symmetry breaking that allowed motility (Figure 1) was essentially due to the modulation of ADF/cofilin severing efficiency by the actin-filament zippering that drives large actin-filament cable formation (Figure 4D; Movie S13). To further test this hypothesis, we used a model (Figure S3) where we included the possibility for actin filaments in close contact with each other to produce cables that are resistant to ADF/cofilin severing (Movie S15). The interaction of ADF/cofilin with actin filaments within bundles is modulated by the filament accessibility and the change of the mechanical properties of bundles. We assumed that the affinity of ADF/cofilin for actin filaments,  $K(N)$ , depends on  $N$ , where  $N$  is the number of actin filaments in the bundle [see Supplemental Data for a discussion of  $K(N)$ ]. This assumption leads to a simulation consistent with the experimental data, in the sense that two large actin cables positioned  $180^\circ$  from each other emanate from the bead (Movie S15).

## Discussion

### Molecular Mechanism for Rapid Actin-Filament Turnover

The use of TIRFM provided unique insights into the mechanism of actin polymerization initiated by the FH1-FH2 domains of mDia1 at the surface of polystyrene beads. We first resolved the controversial role of profilin during the processive mechanism of actin-filament assembly by formin [11, 14]. Profilin increased by 5-fold the rate of addition of actin subunits at the barbed end of an actin filament attached to mDia1; however, profilin was not required for the processive behavior of mDia1, in agreement with Kovar et al. (Movies S5–S6; and [14]). The presence of ADF/cofilin in our reconstituted system caused dramatic changes in the dynamic

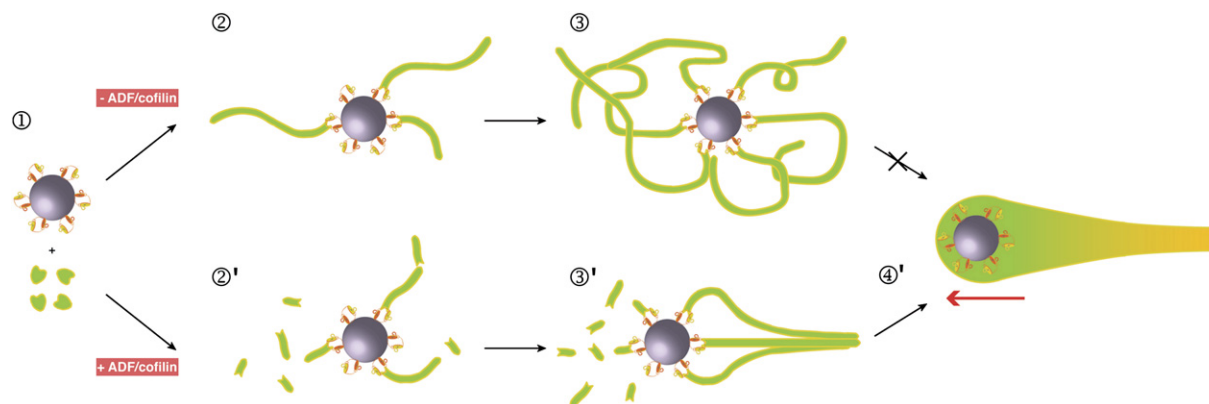


Figure 5. Model for the Link between Rapid Actin-Filament Turnover, Actin-Cable Formation, and Symmetry Breaking Prior to Actin-Based Force Generation

In the absence of ADF/cofilin, formin-coated beads are able to initiate actin filaments (step 1) that grow continuously and randomly around the beads (step 2). This generates a cloud of actin filaments around the beads (step 3). In the presence of ADF/cofilin, actin filaments initiated at the surface of the beads grow and shrink rapidly (step 2'). Lateral contact between actin filaments favors actin-bundle formation and enhances their stability against ADF/cofilin (step 3'). This selection process is the basis for symmetry breaking and actin force generation (step 4').

behavior of individual actin filaments. We report here, for the first time, that single actin filaments can grow and shorten stochastically because ADF/cofilin clips the aged ends of continuously growing actin filaments.

In actin filaments attached to the beads by mDia1, the apparent rate of subunit loss due to ADF/cofilin severing can increase to values more than  $35 \text{ s}^{-1}$ , in the case of actin-filament shortening. A simple kinetic model constrained by experimental rate constants allowed us to reproduce qualitatively and quantitatively the type of stochastic dynamics that drives growing actin-filament turnover attached to a processive nucleator. Our kinetic model predicts that an actin subunit spends, in our experimental conditions, on average about 43 s on these actin filaments before release. This value is similar to the actin-filament turnover observed *in vivo* in fibroblasts [3], fish keratocytes [4], and yeast actin cables [18, 19]. The fragmentation or severing of growing actin filaments by ADF/cofilin is obviously the main property affecting actin-filament turnover. Severing has been reported previously but only on prepolymerized actin filaments (most likely in the ADP state) [20–23]. Here we observed for the first time the severing of growing filaments in real time. We predict that severing is modulated by the nucleotide status of subunits as they age along the length of a filament. To be efficient, this highly dynamic system needs to spatially separate zones of polymerization and fragmentation. The nucleotide state of actin filaments—ATP, ADP- $P_i$ , or ADP—is then absolutely required as a timer controlling the efficiency of ADF/cofilin [16] and limits the possible fragmentation of actin filaments near the origin of nucleation where actin filaments are most likely ATP loaded [24]. Indeed, the average subunit residence time on a growing actin filament in the presence of a large concentration of ADF/cofilin reaches a lower limit of 25 s, essentially because of the presence of ATP-actin subunits in the filament (Figure 3E). Moreover, stabilization of the ADP- $P_i$  state of actin filaments by addition of  $\text{BeF}_3$  prevents the ADF/cofilin dynamizing effect (Movie S9).

#### Model for Actin-Cable, or Bundle, Formation by the Synergistic Effects of Formin, Profilin, and ADF/Cofilin

Formin was initially reported to generate actin cables in yeast [25, 26]. A careful observation of yeast actin cables revealed that they are highly dynamic structures [18]. However, the actin-filament dynamics reported here raise the question of how such large actin-based structures can be generated and stabilized against the dynamizing activity of ADF/cofilin. We revealed that the dynamics of a single actin filament are related to whether it is laterally associated with another actin filament (Figure 5). Indeed, actin filaments comprising cables are partially stabilized against ADF/cofilin-mediated severing. Whereas single actin filaments rapidly grow and shrink and maintain an almost constant length after the initial growth period (Figure 5, step 2'), actin filaments organized into longitudinal structures grow more rapidly than they shrink, on average, allowing actin-cable formation (Figure 5, step 3'). This phenomenon can be easily explained if we consider the mechanism of action of ADF/cofilin. To have efficient severing activity, this protein needs to bind the side of actin filaments. However, ADF/cofilin binding to actin filaments is extremely slow and probably limited by filament breathing because of thermal fluctuations [27]. We propose that the increased mechanical rigidity of actin-filament bundles in comparison to that of isolated actin filaments [28] partially suppresses the filament breathing that is necessary for ADF/cofilin to bind efficiently. In addition, actin filaments inside a large actin-based structure, such as a bundle, are potentially less accessible to ADF/cofilin. Moreover, the severing of a bundle would require the simultaneous fragmentation of all actin filaments at the same location in the bundle, which must be an infrequent event. By growing rapidly, actin filaments generated close together by formin can associate laterally before destruction by ADF/cofilin (Figure 5, step 3'). This is a remarkable system because the actin-based structure controls its own stability.



## Relationship between Actin-Cable Stability and Symmetry Breaking during Actin-Based Motility

Actin bundles generated at the surface of mDia1-coated beads are able to generate enough force to propel the bead (Figure 5, step 4'). However, mDia1 is most likely coated uniformly around a bead, and in the absence of ADF/cofilin, early polymerization events generate a symmetrical actin filament "cloud" (Figure 5, steps 2 and 3). We propose that the symmetry breaking necessary for bead motility is directly linked to the cooperative effect of the actin-filament zippering necessary for actin-cable formation and the related consequences to actin-filament stability against ADF/cofilin-mediated severing (Figure 5, steps 2'–4'). The process of initiating these large actin cables is relatively slow because at the beginning, thin bundles do not have an appreciable survival advantage with respect to ADF/cofilin severing and they frequently undergo catastrophic length reductions similar to those of single actin filaments. The symmetry-breaking phase begins when these bundles fuse together to form stiffer and larger structures. At this stage, both experimental data and simulations show that these bundles are strongly stabilized against ADF/cofilin, and the only noticeable change comes from the reduction of the population of bundles to two to four cables evenly distributed around the bead. Our experimental and in silico approaches do not include any crosslinking between filaments by specific proteins, such as fascin, villin, fimbrin, and  $\alpha$ -actinin. In the presence of these actin-binding proteins, we predict that the resulting bundles would be stiffer and, as a consequence, would affect the process of cable formation by selection. The whole selection process is a simple and robust way to account for the emergence of the actin-based structures necessary for the production of forces of sufficient magnitude to drive beads or any other subcellular structure or membrane.

## Experimental Procedures

### Protein Expression and Production

Actin was isolated from rabbit-skeletal-muscle acetone powder [29]. Monomeric Ca-ATP-actin was purified by gel-filtration chromatography on Sephacryl S-300 [30] at 4°C in G buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM DTT). Actin was labeled on Cys-374 to a stoichiometry of 0.8–1.0 with pyrene iodoacetamide [31]; as modified by Pollard [32] or on lysines with rhodamine or Alexa-532, according to Isambert et al. [33]. MgATP actin was prepared by incubation of Ca-ATP-actin on ice with 0.2 mM EGTA and an 11-fold molar excess of MgCl<sub>2</sub> over actin and used within 1 hr. Actin was polymerized by addition of one-tenth volume of 10× KMEI (500 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, and 100 mM imidazole-HCl [pH 7.0]). Profilin [34], Formin mDia1, FH1-FH2 domain [35], and human ADF/cofilin [36] were purified as described.

### Coating of Beads

Carboxylated polystyrene microspheres (2  $\mu$ m, Polyscience, Eppenheim, Germany) were coated with the indicated concentration of mDia1 FH1-FH2 according to Romero et al. [11].

### Motility Assay

Beads were mixed with a motility medium containing 8  $\mu$ M F-actin, 4  $\mu$ M profilin, and 10  $\mu$ M human cofilin in X buffer (10 mM HEPES [pH 7.8], 0.1 M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>), supplemented with 1% BSA, 0.2% methylcellulose, 3 mM DTT, 1.8 mM ATP, and 0.1 mM DABCO. Image acquisition was performed on a Zeiss Axioplan microscope (Jena, Germany) equipped with a 63×/1.5 Plan-APOCHROMAT objective lens, and images were

collected with a Hamamatsu ORCA CCD camera (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) with Metavue version 6.2r6 (Universal Imaging, Media, PA).

### Total-Internal-Reflection-Fluorescence-Microscopy

Glass flow cells were cleaned and prepared according to Kovar et al. [12]. Rhodamine-actin and Alexa-532-labeled actin-filament polymerization was observed and acquired as specified by Michelot et al. [13]. All data were analyzed with MetaMorph version 6.3r7 and plotted with Kaleidagraph v4.01 software (Synergy Software, Reading, PA).

### Data Analysis

Elongation rates were determined by the measurement of filament lengths with MetaMorph version 6.2r6 during actin-filament elongation. Linear fits were made to the plots of length over time; the slopes represented elongation rates. Rates were converted from  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  to  $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  through the use of 333 actin monomers per micrometer [9]. All plots and fits were realized with Kaleidagraph v3.6 software.

### Model of Actin-Filament Dynamics

We adapted the Gillespie algorithm to simulate the polymerization of actin filaments in a reaction-diffusion system (see Supplemental Data). The model for the zippering of filaments into bundles, as well as filament or bundle severing by ADF/cofilin, is discussed in the Supplemental Data section.

### Supplemental Data

Experimental Procedures, three figures, one table, and fifteen movies are available at <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/17/10/825/DC1/>.

### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Henry N. Higgs for providing mDia1 FH1-FH2 and useful suggestions on the manuscript. This work was funded through grants from the Actions Thématiques et Initiatives sur Programmes et Equipes Plus (ATIP+) and Agence Nationale de la Recherche to L.B. and from the National Research Initiative of the United States Department of Agriculture (USDA) Cooperative State Research, Education, and Extension Service, grant number 2002-35304-12412, to C.J.S.

Received: January 19, 2007

Revised: March 16, 2007

Accepted: April 12, 2007

Published online: May 10, 2007

### References

- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Mogilner, A. (2006). On the edge: Modeling protrusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 32–39.
- Wang, Y. (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* 101, 597–602.
- Theriot, J.A., and Mitchison, T.J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 126–131.
- Medeiros, N.A., Burnette, D.T., and Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat. Cell Biol.* 8, 215–226.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* 7, 619–625.
- Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: From cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 605–645.
- Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103, 2747–2754.

9. Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
10. Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613–616.
11. Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119, 419–429.
12. Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14725–14730.
13. Michelot, A., Derivery, E., Paterski-Boujemaa, R., Guerin, C., Huang, S., Parcy, F., Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2006). A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr. Biol.* 16, 1924–1930.
14. Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* 124, 423–435.
15. Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., and Ishiwata, S. (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat. Cell Biol.* 4, 666–673.
16. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538–15546.
17. Huang, S., Robinson, R.C., Gao, L.Y., Matsumoto, T., Brunet, A., Blanchoin, L., and Staiger, C.J. (2005). Arabidopsis VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *Plant Cell* 17, 486–501.
18. Yang, H.C., and Pon, L.A. (2002). Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 751–756.
19. Martin, S.G., and Chang, F. (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr. Biol.* 16, 1161–1170.
20. Ichetovkin, I., Han, J., Pang, K.M., Knecht, D.A., and Condeelis, J.S. (2000). Actin filaments are severed by both native and recombinant *Dictyostelium* cofilin but to different extents. *Cell Motil. Cytoskeleton* 45, 293–306.
21. Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* 24, 13–23.
22. Maciver, S.K., Zot, H.G., and Pollard, T.D. (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* 115, 1611–1620.
23. Pavlov, D., Muhlrud, A., Cooper, J., Wear, M., and Reisler, E. (2007). Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* 365, 1350–1358.
24. Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.
25. Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4, 260–269.
26. Sagot, I., Klee, S.K., and Pellman, D. (2002). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4, 42–50.
27. Cao, W., Goodarzi, J.P., and De La Cruz, E.M. (2006). Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* 361, 257–267.
28. Mogilner, A., and Rubinstein, B. (2005). The physics of filopodial protrusion. *Biophys. J.* 89, 782–795.
29. Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866–4871.
30. MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* 20, 329–341.
31. Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.* 114, 33–38.
32. Pollard, T.D. (1984). Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* 99, 769–777.
33. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437–11444.
34. Fedorov, A.A., Pollard, T.D., and Almo, S.C. (1994). Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 241, 480–482.
35. Li, F., and Higgs, H.N. (2003). The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr. Biol.* 13, 1335–1340.
36. Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136, 1307–1322.



# Actin-Filament Stochastic Dynamics Mediated by ADF/Cofilin

Alphée Michelot, Julien Berro, Christophe Guérin, Rajaa Boujemaa-Paterski, Christopher J. Staiger, Jean-Louis Martiel, and Laurent Blanchoin

## Supplemental Experimental Procedures

### Actin-Filament Dynamics in Space and Time

The reactions listed in Table 1 were simulated according to the Gillespie algorithm with rejection (see above) in a flat parallelepiped domain ( $10 \times 10 \times 0.1 \mu\text{m}$ ). The extension in the third dimension ( $0.1 \mu\text{m}$ ) is of the order of the evanescent-wave penetration depth. The proteins (actin monomers, profilin, and ADF/cofilin) diffused in space; we also considered translational and rotational random movements for actin-filament fragments and determined diffusion coefficients by applying the theory of polymer diffusion [S1]. We also neglected any filament shape change (thermal fluctuations or drag by viscous forces) that might affect the position of the filaments in space. This assumption, which is valid during the early phase when filament lengths are less than the persistence length ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ), does not weaken the model or our conclusions and numerical simulation over long periods is facilitated. Because the concentration of actin monomers is high and all actin-filament barbed ends are rooted on the circular line, where formins are located, the filament growth does not depend on filament shape changes away from the bead. Rather, numerical simulations showed that the elongation rate depends on the supply of fresh actin monomers to the reaction site and on the density of formins on the circular line (data not shown).

### Gillespie Algorithm with Rejection

We developed a multi-agent program for reaction-diffusion systems on the basis of a modified version of the Gillespie algorithm to simulate the kinetics of polymerization and chemical transformation of actin filaments [S2].

Molecules or fragments of filament diffusion use a timeframe with constant time step  $dt$ . We divided the space into square domains (the edge is  $\sqrt{4Ddt}$ , where  $D$  is the maximal diffusion coefficient of the different species), that represent the area available to molecules through diffusion movements during  $dt$ . Therefore, by assuming that the molecules' distribution in a specific domain is homogeneous, we could use the Gillespie algorithm to simulate the random occurrence of reactions. This assumption is valid as long as the cumulated time between reactions from the last diffusion update does not exceed  $dt$  (Figure S1). Synchronization between the two timeframes occurs when the expected next reaction would take place after  $dt$  seconds

Table S1. Rate Constants Used for the Kinetic Model

Reaction	Rate Value	Reference
G-actin-ATP association, free barbed end	$11.6 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	[S6]
G-actin-ATP dissociation, free barbed end	$1.4 \text{ s}^{-1}$	[S6]
G-actin-ADP dissociation, free barbed end	$7.2 \text{ s}^{-1}$	[S6]
G-actin-ATP dissociation, pointed end	$0.8 \text{ s}^{-1}$	[S6]
G-actin-ADP dissociation, pointed end	$0.26 \text{ s}^{-1}$	[S6]
FATP hydrolysis into FADP-P <sub>i</sub>	$0.35 \text{ s}^{-1}$	[S7]
P <sub>i</sub> release	$0.0019 \text{ s}^{-1}$	[S8]
P <sub>i</sub> release in the presence of ADF/cofilin	$0.03 \text{ s}^{-1}$	[S9]
ADF/cofilin association to F-actin	$0.0085 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	[S9]
ADF/cofilin dissociation from F-actin	$0.005 \text{ s}^{-1}$	[S9]
F-actin severing by ADF/cofilin	$0.012 \text{ s}^{-1}$	[S9]
Cooperative association of ADF/cofilin to F-actin	$0.075 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	[S9]
Filament nucleation by formin	$5.8 \cdot 10^{-4} (\mu\text{M})^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$	this study
G-actin-ATP association at the barbed end in presence of formin and profilin	$40 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	this study

from the last diffusion update (Figure S1). In that case, we rejected the last reaction predicted by the algorithm, and we updated the molecule positions according to diffusion before resuming the simulation of reactions. We proved that the Gillespie algorithm with rejection is exact and gives the same probability distribution for the reactions as the regular method (data not shown).

### ADF/Cofilin Binding to Single Filaments and Severing

ADF/cofilin molecules bind to actin filaments in a cooperative manner to form pairs of adjacent actin-filament subunits decorated with ADF/cofilin (cf Table S1). We assumed that severing of the actin

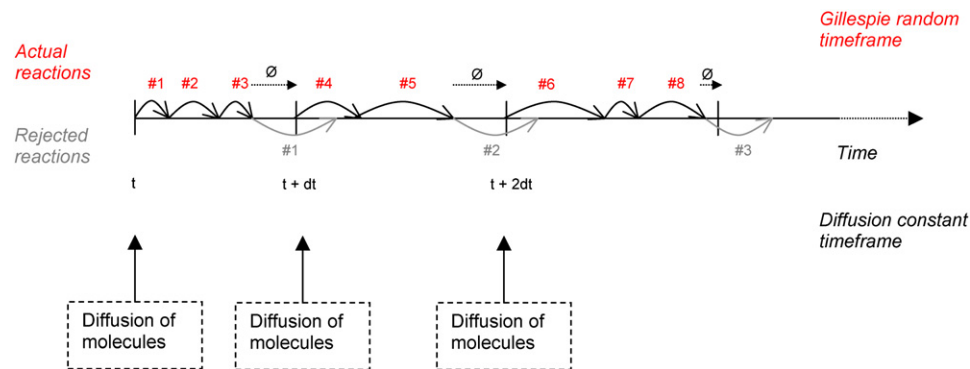


Figure S1. Schematic Representation of the Gillespie Algorithm with Rejection

Molecules move by diffusion every  $dt$  seconds (Diffusion timeframe). Between two successive movement updates, reactions occur at a random time given by the Gillespie algorithm (Gillespie random timeframe). When the cumulated time interval between two successive reactions exceeds  $dt$ , the next reaction predicted by the Gillespie method is rejected. The Gillespie method resumes after the updating of the position of several molecules.



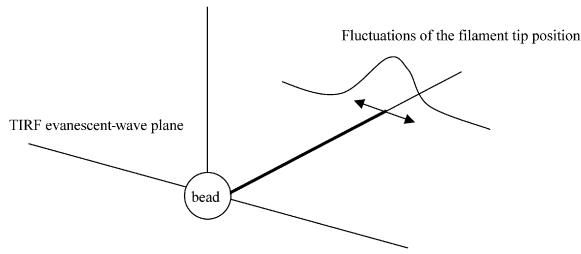


Figure S2. Schematic Representation of Filament-Tip Fluctuations Subjected to Thermal Noise

The extension of filament fluctuations in space is indicated by the double arrow. The probability distribution of the position of the tip is Gaussian, with zero mean and variance  $\sigma^2 = L^3 / (3L_p)$ .

filament could occur at any pair of decorated actin subunits with equal probability, regardless of the actual position of the pair in the actin filament.

### Bundling Algorithm

Bundling of actin filaments through nonspecific interaction occurs when fluctuations of thermal origin bring two actin filaments in close position and allows zippering between actin filaments or between filaments and already-formed bundles. We modeled actin filaments as elastic beams with one end maintained at the bead surface and the tip left free (Figure S2). The position of the free end is a zero-centered Gaussian with variance

$$\langle X^2 \rangle = \frac{L^3}{3L_p},$$

where  $L$  is the actin-filament length and  $L_p$  its persistence length [S3] (see Figure S3). We consider two actin filaments (or bundles) of length  $L_1$  and  $L_2$  and persistence length  $L_{p1}$  and  $L_{p2}$ . We assume  $L_{1,2}$  to be sufficiently large so that the fluctuations of the filament free-end positions are independent. Therefore, the probability of encounters is approximately

$$PE = \frac{1}{\sqrt{2\pi(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}} \exp\left(-\frac{\Delta L^2}{2(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}\right)$$

where  $\sigma_1^2 = L_{\min}^3 / (3L_{p1})$ ,  $\sigma_2^2 = L_{\min}^3 / (3L_{p2})$ ,  $L_{\min} = \min(L_1, L_2)$ , and  $\Delta L = 2L_{\min} \sin(\theta/2)$  ( $\theta$  is the angular separation of the filaments on the bead in Figure S3).

### Severing of Bundles

Theoretical studies and experiments have shown that the persistence length of bundles with  $N$  independent filaments is  $L_{p, \text{Bundle}} \approx NL_p$ , where  $L_p$  is the persistence length of a single filament [S4, S5]. Because this increased rigidity partially reduces the capacity for ADF/cofilin to bind actin filaments, we assume that ADF/cofilin

binding ( $k_{\text{on, Bundle}}$ ) and severing ( $k_{\text{sev, Bundle}}$ ) rate constants for actin filaments organized into bundles will change according to

$$\left(\frac{k_{\text{on, Bundle}}}{k_{\text{on, Filament}}}\right) = \left(\frac{k_{\text{sev, Bundle}}}{k_{\text{sev, Filament}}}\right) = \frac{1}{N},$$

where  $k_{\text{on, Filament}}$  and  $k_{\text{sev, Filament}}$  are the corresponding rate constants for ADF/cofilin interacting with an isolated filament. In addition, we assume that actin filaments inside a large bundle are potentially less accessible to ADF/cofilin. Therefore, the apparent on rate constant of ADF/cofilin to such filaments is now a function of the number of actin filaments in the bundle. Finally, the severing of a bundle of  $N$  filaments is equivalent to the simultaneous breaking of  $N$  isolated independent filaments. After the combination of these different contributions, the on and off rate constants of ADF/cofilin binding and the severing rate used in simulations are

$$\left(\frac{k_{\text{sev, Bundle}}}{k_{\text{sev, Filament}}}\right) = \frac{1}{N^2}, \quad \left(\frac{k_{\text{on, Bundle}}}{k_{\text{on, Filament}}}\right) = \frac{1}{N^{2.5}}, \quad k_{\text{off, Bundle}} = k_{\text{off, Filament}}.$$

The equivalent affinity of ADF/cofilin to actin filament in bundles is now

$$K(N) = \left(\frac{k_{\text{on, Bundle}}}{k_{\text{off, Bundle}}}\right) = \frac{1}{N^{2.5}} \left(\frac{k_{\text{on, Filament}}}{k_{\text{off, Filament}}}\right).$$

### Supplemental References

- S1. Doi, M., and Edwards, S.F. (1986). The Theory of Polymer Dynamics. (Oxford: Oxford University Press).
- S2. Gillespie, D.T. (1977). Exact Stochastic Simulation of Coupled Reactions. J. Phys. Chem. 81, 2340–2361.
- S3. Howard, J. (2001). Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. (Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.).
- S4. Mogilner, A., and Rubinstein, B. (2005). The physics of filopodial protrusion. Biophys. J. 89, 782–795.
- S5. Claessens, M.M., Bathe, M., Frey, E., and Bausch, A.R. (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. Nat. Mater. 5, 748–753.
- S6. Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. J. Cell Biol. 103, 2747–2754.
- S7. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (2002). Hydrolysis of bound ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. Biochemistry 41, 597–602.
- S8. Melki, R., Fievez, S., and Carlier, M.-F. (1996). Continuous monitoring of P<sub>i</sub> release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. Biochemistry 35, 12038–12045.
- S9. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. J. Biol. Chem. 274, 15538–15546.

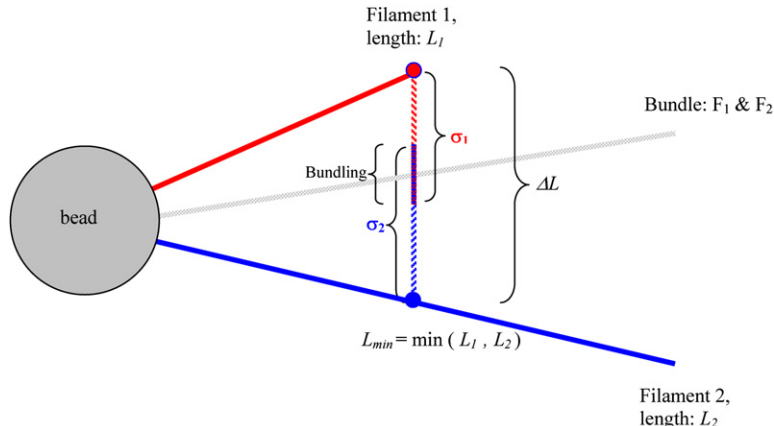


Figure S3. Illustration of the Bundling Algorithm

Single filaments  $F_1$  and  $F_2$ , respectively represented by thick red and blue segments, grow from the bead. If actin filaments were rigid rods, the maximal separation at  $L_{\min}$  would be  $\Delta L$ . The red and blue striped lines represent the spatial domain visited by  $F_1$  and  $F_2$ , respectively, during fluctuations; a favorable encounter occurs in the common domain painted purple. The light gray line illustrates the bundle resulting from the union of  $F_1$  and  $F_2$ .

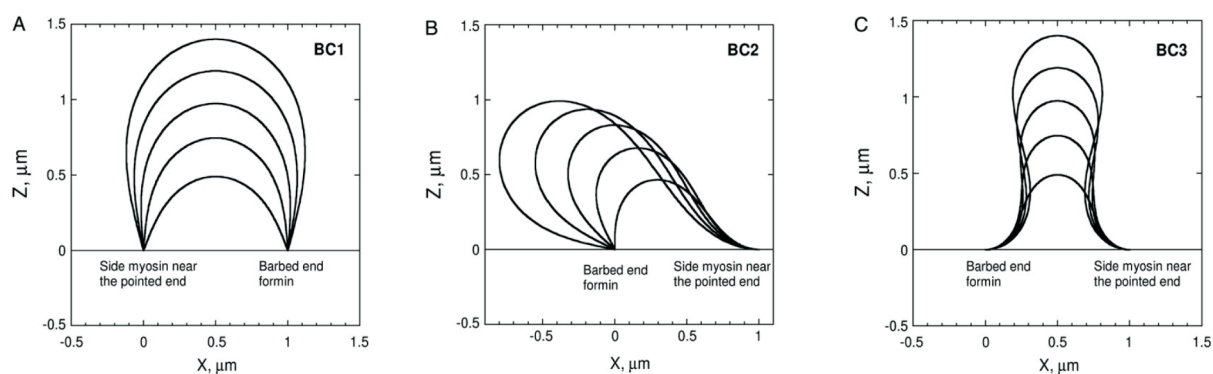
***Article 4 : Les conditions d'attachement contrôlent le flambage des filaments d'actine et la production de forces.***

**Julien Berro, Alphée Michelot, Laurent Blanchoin, David R. Kovar, et Jean-Louis Martiel.**

**Résumé :**

Avec les travaux de Hill et Kirschner en 1982 fut apporté la preuve que l'énergie libre associée à la réaction de polymérisation d'un biopolymère pouvait être directement transformé en énergie mécanique dans les cellules vivantes (Hill, 1981). Par la suite, les travaux de Wang en 1985 puis de Theriot et Mitchison en 1991 ont suggéré que la polymérisation des filaments d'actine contre la membrane pouvait être responsable de la force exercée lors de la protrusion du lamellipode (Wang, 1985), (Theriot and Mitchison, 1991). La mesure expérimentale de telles forces se révélant technologiquement difficile, en particulier à l'échelle du filament individuel, de nombreuses études se sont attachées dans un premier temps à comprendre le mécanisme physique par lequel cette transduction pouvait se faire (Peskin et al., 1993), (Mogilner and Oster, 1996), (Mogilner and Oster, 2003). Récemment, la mise au point de la technique de microscopie à onde évanescente permettant d'observer en temps réel la polymérisation de filaments individuels d'actine a rendu envisageable la mesure de l'amplitude des forces générées par la polymérisation de l'actine contre une cible. Parallèlement, la découverte du mécanisme processif des formines a permis de trouver un moyen de contraindre l'extrémité barbée d'un filament d'actine en un point fixe sans bloquer son élongation (Sagot et al., 2002b), (Pruyne et al., 2002), (Kovar et al., 2003), (Harris et al., 2004). En liant le côté d'un filament d'actine sur une lame de microscope par l'intermédiaire d'une myosine dont l'activité motrice a été inactivée, et l'extrémité de ce même filament à une formine processive en un autre endroit de la lame, Kovar and Pollard ont été capables en 2004 de provoquer le flambage de ce filament d'actine par la seule force de polymérisation. La connaissance des propriétés mécaniques de ce polymère semi-rigide (principalement la longueur de persistance des filaments d'actine) a permis aux auteurs par un modèle simple de donner pour la première fois une borne inférieure de 1.3 pN à l'amplitude de la force exercée par la polymérisation d'un filament contre une cible (Kovar and Pollard, 2004).

Cet article correspond à un modèle physique beaucoup plus détaillé du phénomène de flambage des filaments d'actine, utilisant les équations connues sur les propriétés élastiques des bâtonnets rigides. Une observation attentive des événements de flambage a en effet permis de déterminer trois jeux de conditions aux limites. Dans les conditions aux limites dites BC1, le filament d'actine peut pivoter autour de ses deux points fixes attachés à la lame (voir Figure 40A), probablement parce que ni la formine ni la myosine ne sont suffisamment rigides pour empêcher ces rotations. Dans les conditions aux limites BC2, le filament d'actine peut pivoter autour d'un de ces deux points fixes seulement, le filament gardant une orientation constante par rapport à la lame à l'autre point fixe (voir Figure 40B). Enfin, dans les conditions aux limites BC3, le filament reste fixe autour de ces deux points fixes (voir Figure 40C), mais peut néanmoins flamber.



**Figure 40 : Différentes conditions aux limites lors du flambage des filaments d'actine.**

(A) Conditions BC1 : le filament peut pivoter autour de ses deux extrémités.

(B) Conditions BC2 : le filament peut pivoter autour d'une extrémité ; l'autre extrémité garde une direction constante.

(C) Conditions BC3 : les deux extrémités du filament gardent une direction constante.

Pour les différentes conditions aux limites, le modèle permet dans un premier temps de déterminer les configurations spatiales adoptées par le filament pendant le flambage, en fonction de la longueur  $l$  du filament et de la distance  $a$  entre les deux extrémités fixes ( $l \geq a$ , voir Figure 40, où  $l$  varie avec  $a = 1 \mu\text{m}$ ). Ensuite, le modèle permet alors de déterminer en fonction de la distance  $a$ , 1/ les contraintes imposées au filament d'actine pendant le flambage, 2/ les forces appliquées aux extrémités du filament d'actine, 3/ la concentration d'actine monomérique nécessaire pour développer de telles forces.

D'un point de vue qualitatif, le modèle a permis de montrer que la force exercée par les filaments est la plus importante au moment du flambage. Une surprise fut de voir que la force exercée par les filaments sur la surface dépend fortement des conditions aux limites. Pour les conditions BC2, la force produite est environ deux fois plus importante

que pour les conditions BC1, et pour les conditions BC3, la force produite est environ quatre fois plus importante que pour les conditions BC1. Ensuite, ce modèle montre que les forces au début du flambage sont très importantes pour des distances  $a$  entre les points fixes faibles. Ensuite, elle diminue rapidement en  $1/a^2$  quand la distance entre les points fixes augmente.

D'un point de vue quantitatif, ce modèle a permis de revoir à la hausse toutes les valeurs estimées pour la polymérisation d'un filament d'actine unique. Pour des distances entre points fixes de l'ordre du  $\mu\text{m}$ , les forces générées sont de l'ordre du pN. Quand cette distance diminue, les forces générées augmentent dramatiquement. Pour des distances entre points fixes inférieures à  $0.5 \mu\text{m}$ , les forces produites dépasseraient 10 pN. Enfin, le modèle a permis d'évaluer les concentrations d'actine monomériques nécessaires à l'exercice de telles forces. L'exercice de forces de l'ordre de 10 pN requiert une concentration d'actine monomérique de l'ordre de  $10\text{-}50 \mu\text{M}$ . Une des forces de ce modèle est que les ordres de grandeur qu'il donne sont parfaitement compatibles avec les caractéristiques cellulaires. En particulier, les filaments d'actine sont généralement ancrés à moins de  $0.5 \mu\text{m}$  de la membrane (Svitkina and Borisy, 1999a), et des forces de 10 pN correspondent à l'ordre de grandeur qui est attendu pour la déformation de membranes biologiques (Hochmuth et al., 1996).

Ce travail a été principalement réalisé par Julien Berro qui travaille dans l'équipe de Jean-Louis Martiel. Ma contribution à cet article fut d'une part expérimentale, mais j'ai aussi assuré le lien entre la partie expérimentale et théorique de cette étude. L'acquisition de nombreux événements de flambage a permis de vérifier que les configurations spatiales observées expérimentalement correspondaient avec celles qui sont prédites par le modèle.



# **ARTICLE 4**



# Attachment Conditions Control Actin Filament Buckling and the Production of Forces

Julien Berro,\* Alphonse Michelot,<sup>†</sup> Laurent Blanchoin,<sup>‡</sup> David R. Kovar,<sup>‡</sup> and Jean-Louis Martiel\*

\*Laboratoire Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Complexité, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Université Joseph Fourier, F38706, La Tronche, France; <sup>†</sup>Institut de Recherches en Technologie et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique and Université Joseph Fourier, F38054, Grenoble, France; and <sup>‡</sup>Departments of Molecular Genetics and Cell Biology, and Biochemistry and Molecular Biology, The University of Chicago, Chicago, Illinois

**ABSTRACT** Actin polymerization is the driving force for a large number of cellular processes. Formation of lamellipodia and filopodia at the leading edge of motile cells requires actin polymerization induced mechanical deformation of the plasma membrane. To generate different types of membrane protrusions, the mechanical properties of actin filaments can be constrained by interacting proteins. A striking example of such constraint is the buckling of actin filaments generated in vitro by the cooperative effect of a processive actin nucleating factor (formin) and a molecular motor (myosin II). We developed a physical model based on equations for an elastic rod that accounts for actin filament buckling. Both ends of the rod were maintained in a fixed position in space and we considered three sets of boundary conditions. The model qualitatively and quantitatively reproduces the shape distribution of actin filaments. We found that actin polymerization counterpoises a force in the range 0.4–1.6 pN for moderate end-to-end distance ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) and could be as large as 10 pN for shorter distances. If the actin rod attachment includes a spring, we discovered that the stiffness must be in the range 0.1–1.2 pN/nm to account for the observed buckling.

## INTRODUCTION

Actin filament nucleation and elongation, which promotes lamellipodia formation, propulsion of pathogens or endosomes, and other processes controlling cell plasticity (for a general review, see Pollard and Borisy (1)), is controlled by a variety of accessory protein with diverse properties. The Arp2/3 complex is the best understood actin filament nucleation factor (1). However, a second nucleation factor has been a recent focus of intense study. Formin participates in the formation of a growing list of actin-based higher ordered structures (2), including actin cables in yeast (3), the cytokinetic ring (4), focal adhesions (5–7), cell migration and ruffling (8,9), endosome motility (10), and filopodia (11,12). Direct in vivo observations (10) and in vitro experiments (13–16) have shown that formins are processive nucleators, which remain continuously attached to the fast growing actin filament barbed end while directing insertion of actin monomers at that end (17).

Macromolecular assembly has the capacity to convert chemical energy into forces that can move intracellular endosomes, cell membrane, or experimental objects, like polystyrene beads. However, the molecular mechanisms underlying force generation is still under debate: for instance, *Listeria* propulsion, a well-documented experimental model for cell motility (2), is not totally understood, although different models have been proposed (17–21).

To elucidate the conversion of chemical energy into mechanical work, the use of total internal reflection fluores-

cence (TIRF) microscopy has been a valuable tool to study the properties of individual actin filament under ligand constraint (13). Indeed, this technique was utilized to evaluate the force induced by a single actin filament (13). In these experiments, the region near the pointed end of an actin filament is tethered to a rigid surface through side binding to an inactive myosin molecule whereas the barbed end is capped by a formin grafted to the surface. Actin polymerization continues at the formin-associated barbed end while the end-to-end distance of the filament is constrained in space. Therefore, the filament buckles and its configuration depends on the balance of the processive forces developed by actin polymerization and the spatial constraints imposed on the two ends.

We report the analysis of two-dimensional buckling by a mechanical model accounting satisfactorily for the spatial configurations of actin filaments and for the force/filament-length relationship. We propose a direct semiquantitative measure of the forces developed by a growing filament against its ends. We also show that the actin monomer concentration required to begin buckling is  $\sim 1\text{--}10 \mu\text{M}$  for actin filament lengths above  $0.5 \mu\text{m}$ . Shorter actin filaments (end-to-end distance between 0.2 and  $0.5 \mu\text{m}$ ) necessitate actin monomers concentration up to  $10 \mu\text{M}$  to buckle. Finally, we predict that the stiffness of the bonds between the surface and actin filament should be in a  $0.2\text{--}1.2 \text{ pN nm}^{-1}$  range, which is consistent with the experimental values obtained for the cross-bridge stiffness in acto-myosin cables. We also show that below a critical end-to-end length, actin filaments cannot buckle in realistic conditions regardless of the amount of free actin monomers or bond robustness.

Submitted August 3, 2006, and accepted for publication November 22, 2006.

Address reprint requests to Jean-Louis Martiel, Tel.: 33-4-56-52-00-69; E-mail: jean-louis.martiel@imag.fr.

© 2007 by the Biophysical Society

0006-3495/07/04/2546/13 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.106.094672



## MATERIALS AND METHODS

### Total internal reflection fluorescence microscopy

Rhodamine actine polymerization was observed on an Olympus IX-71 inverted microscope equipped with a 60×, 1.45 NA Planapo objective (Olympus, Melville, NY), and modified as described (22) for TIRF illumination. The laser used for these experiments was an Omicron Laserage LAPE 1007 (Latronics, Aachen, Germany) emitting a 532-nm wavelength, and limited to 10 mW. The time course of actin polymerization was acquired with a Hamamatsu ORCA-ER camera (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Germany) using MetaMorph version 6.2r6 (Universal Imaging, Media, PA).

Glass flow cells were coated with a mixture of *N*-ethyl-maleimide (NEM)-myosin and mouse formin mDia1 or yeast Bni1p for 1 min, then washed extensively with 1% BSA for another minute (23). A mixture of 1  $\mu$ M rhodamine actine bound to 5  $\mu$ M profilin in fluorescence buffer (10 mM imidazole-HCl, pH 7.0, 50 mM KCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 20  $\mu$ g/ml catalase, 100  $\mu$ g/ml glucose oxidase, 15 mg/ml glucose, 0.5% methylcellulose) was injected into the flow cell. Actin polymerization and buckling events were observed a few minutes after injection.

## RESULTS

### Model

We used total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) to observe the transition between initial (Fig. 1 A, *left column*) and buckled configuration (Fig. 1 A, *right column*) of growing actin filaments bound to the microscope slide by formin (barbed end filament) or by NEM myosin II (side binding near the pointed end filament). To analyze the part of attachment conditions in the production of the buckling force, we develop a mechanical model for filament bending, as shown in Fig. 1 B. The curve represents the filament centerline whose extremities are fixed in space and we note  $\theta$ , the angle between the unit vector tangent to the curve and the horizontal axis; the other variables or parameters used in the model are listed in Table 1.

The theory of elastic rods (Kirchhoff equations, (24)) expresses the conditions for mechanical equilibrium of elastic rods given the geometrical and mechanical constraints on the extremities. In Appendix A, we present a derivation of the equations and boundary conditions, as well as the elementary properties of the solutions (Appendix B). The equations for the rod position and orientation read

$$\begin{aligned} L_p \frac{d^2 \theta}{ds^2} &= -N_1 \sin \theta + N_3 \cos \theta, \\ \frac{dx}{ds} &= \cos \theta, \\ \frac{dz}{ds} &= \sin \theta, \end{aligned} \quad (1)$$

where  $L_p$  is the persistence length of the actin filament and  $s$  is the arclength measured along the rod centerline;  $\theta$  is the angle between the tangent to the filament centerline and the horizontal axis;  $x$  and  $z$  are the Cartesian coordinate of the point at arclength  $s$  (Fig. 1 B). In Appendix A, we show that the force vector that balances the surface reaction at  $s = 0$  and  $s = L$  is constant. Its horizontal and vertical components

denoted, respectively,  $N_1$  and  $N_3$ , are unknown quantities that will be determined as part of the solution of equations in Eq. 1. The first equation in Eq. 1 expresses the balance between bending, due to local change of the filament centerline curvature, and the moment of the force (respectively,  $L_p(d^2\theta/ds^2)$  and  $N_1 \sin(\theta) - N_3 \cos(\theta)$ ). The second and third equations give the components of the unit vector tangent to the rod centerline.

The experimental setup imposes fixed positions to the two filament ends to which correspond four geometrical conditions associated with the position of actin filament extremities

$$\begin{aligned} x(0) &= 0, \quad z(0) = 0, \\ x(L) &= a, \quad z(L) = 0, \end{aligned} \quad (2)$$

where  $a$  is the constant end-to-end distance ( $a < L$ ). Besides geometrical conditions (2), giving the location of filaments extremities, we impose conditions for the direction of the filament by specifying either the value of the angle  $\theta$  or its derivative with respect to arclength ( $d\theta/ds$ ). From observations of experimental actin filament buckling, all configurations close to the filament ends are amenable to two cases only. In the first situation, the filament changes its direction continuously while its length increases (see, e.g., *left end* of the filament, *middle row* in Fig. 1 A). The corresponding mathematical condition is  $(d\theta/ds) = 0$ , which allows free rotation of the filament end about the attachment point. A second situation is illustrated by the right end of the same filament (Fig. 1 A, *middle row*) where the direction is globally constant throughout elongation; the corresponding condition is  $\theta = 0$ . Therefore, we are left with three possibilities for  $\theta$

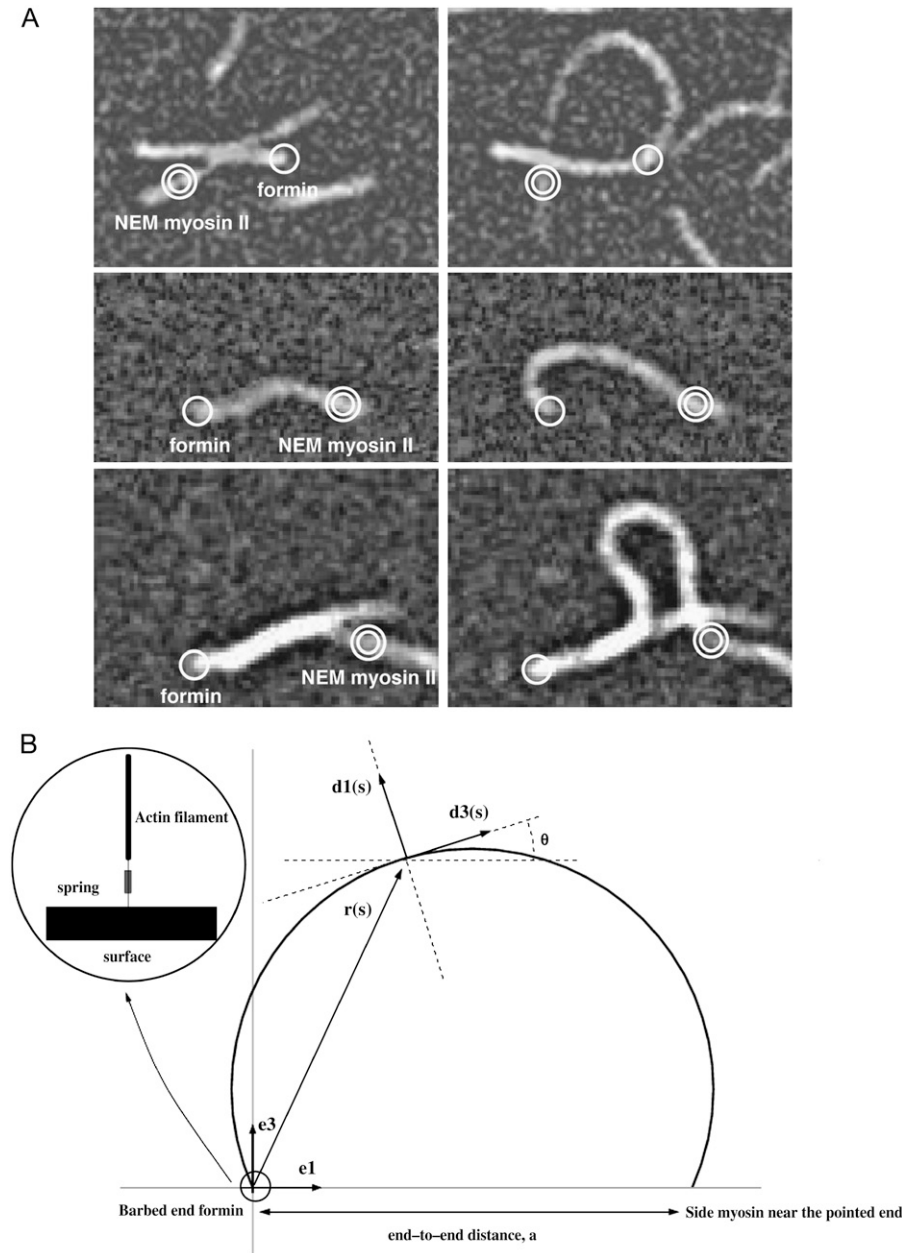
$$\begin{aligned} \text{BC1 : } & \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0} = 0, \quad \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=L} = 0, \\ \text{BC2 : } & \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0} = 0, \quad \theta(L) = 0, \\ \text{BC3 : } & \theta(0) = 0, \quad \theta(L) = 0. \end{aligned} \quad (3)$$

Boundary condition of type 1 (BC1) represents a filament whose both ends can rotate about the attachment point; boundary condition of type 3 (BC3) imposes a horizontal tangent vector to the filament centerline; the third condition (boundary condition of type 2 or BC2) combines both constraints. The solution of Eq. 1, accompanied with conditions in Eq. 2 and one of the conditions listed in Eq. 3, gives the actin filament configuration and the force exerted on the surface.

### Equilibrium configurations and force

All rod configurations obtained with the boundary conditions listed in Eq. 3 (Fig. 2, A, B, and C) are in very good agreement with the experimental results (see also Fig. 3, A and B, in Kovar and Pollard (13)). The model shows that all boundary conditions BC1–3 can happen in realistic conditions and are sufficient to account for the variety of observed actin filament shapes.

During actin filament elongation, bent actin filaments exert a force on the surface via the formin or myosin bond that is



**FIGURE 1** Buckling of filaments and model. (A) The initial (*left column*) and buckled configurations (*right column*) for actin filaments are observed by total internal reflection fluorescence microscopy. Filaments are attached to the microscope slide either by formin (*single circle*) or NEM myosin II (*double circle*). (B) Schematic representation of the filament centerline by a curve. A point on the filament, at position  $\mathbf{r}(s)$ , where  $s$  is the arclength along the filament centerline, is characterized by the material frame  $(\mathbf{d}_1, \mathbf{d}_3)$ , with  $\mathbf{d}_3$  tangent to the filament centerline at  $\mathbf{r}(s)$ . The fixed orthogonal set of unit vectors  $(\mathbf{e}_1, \mathbf{e}_3)$  defines the global orientation of the rod, with the end-to-end vector along the axis  $\mathbf{e}_1$ . During filament buckling, the set of three vectors  $(\mathbf{r}, \mathbf{d}_1, \mathbf{d}_3)$  remains in the plane spanned by  $(\mathbf{e}_1, \mathbf{e}_3)$ . We also define,  $\theta(s)$ , the angle between  $\mathbf{d}_3$  and  $\mathbf{e}_1$ .  $L$  is the total contour length of the filament and  $a$  its constant end-to-end distance. (*Inset*) We model the bond between the filament ends and the surface by an equivalent spring associated with the filament/formin junction.

transduced to the slide surface (in vitro) or to cellular structures (in vivo). The magnitude of the force is not directly proportional to the amplitude of the actin filament curvature: instead, the maximal internal stress occurs for contour lengths just above the end-to-end distance, when actin filaments are almost straight (Fig. 3). For large filament lengths  $L$ , the surface reaction to actin filament bending decreases rapidly (scaling as  $L^{-2}$ ) and becomes negligible for contour lengths comparable to the persistence length (Fig. 3). The results in Fig. 3 bring out the role of boundary conditions in the transmission of forces from the actin filament to the surface. When actin filaments are almost straight, the force is directed along the end-to-end vector with a zero normal component (term  $N_3$  in Eq. 1 and Appendix A). Therefore, the total force

is approximately proportional to the horizontal component of the vector  $\tilde{\mathbf{N}}$

$$|\tilde{\mathbf{N}}| \approx \tilde{N}_1 = k_B T N_1,$$

where  $N_1$  is the horizontal force component in normalized Eq. 1. BC1 conditions, which give an initial force of 0.4 pN ( $L = 1 \mu\text{m}$ ;  $L_p = 15 \mu\text{m}$ ), agree with the classical Euler condition for buckling beams (Eq. B-2, with  $k = 1$ )

$$\tilde{N}_T = k_B T \frac{\pi^2 L_p}{a^2}.$$

For BC2 condition and because of the condition at  $s = L$ , which constrains the filament to be horizontal at one end, the yielded force is  $\sim 0.8$  pN for  $L \sim a$ , as predicted by a linear

**TABLE 1** Model parameters and variables

Symbol	Meaning	Value used in this study	Property or definition
$k_B T$	Thermal energy	$4.05 \cdot 10^{-21}$ J	
$\kappa$	Bending modulus	$6.1 \cdot 10^{-26}$ J m	
$L_p$	Persistence length, $L_p = \kappa/k_B T$	$15 \mu\text{m}$	
$\mathbf{e}_1, \mathbf{e}_3$	Constant unit orthogonal vectors defining the reference plane for bending.		
$L$	Filament length	$0.2\text{--}10 \mu\text{m}$	
$a, \mathbf{a}$	End-to-end distance, end-to-end vector	$0.2\text{--}1.5 \mu\text{m}$	$\mathbf{a} = a\mathbf{e}_1$
$s$	Arclength distance measured along the filament centerline		$0 \leq s \leq L$
$\mathbf{r}(s)$	Point position along the filament at arclength $s$		$\mathbf{r}(L) = \mathbf{r}(0) + \mathbf{a}\mathbf{e}_1$
$x(s), z(s)$	Horizontal and vertical coordinates of $\mathbf{r}(s)$		$\mathbf{r}(s) = x(s)\mathbf{e}_1 + z(s)\mathbf{e}_3$
$\mathbf{d}_3(s)$	Unit vector tangent to the filament centerline at $s$		$\mathbf{d}_3 = d\mathbf{r}/ds = \cos\theta(s)\mathbf{e}_1 + \sin\theta(s)\mathbf{e}_3$
$\theta(s)$	Angle between $\mathbf{d}_3(s)$ and the horizontal axis at $s$		
$\tilde{\mathbf{N}}$	Buckling force		$\tilde{\mathbf{N}} = \tilde{N}_1\mathbf{e}_1 + \tilde{N}_3\mathbf{e}_3$
$\mathbf{N}$	Normalized force		$\mathbf{N} = \tilde{\mathbf{N}}/(k_B T)$

analysis of Eq. 1 (Eq. B-4, with  $k = 1$ ). Furthermore, since the BC3 condition imposes that both tangents are horizontal, in agreement with the analysis of linearized Eq. 1 in Appendix B (Eq. B-5), the force is high ( $\sim 1.6$  pN).

In the presence of a large excess of actin monomer, actin filament elongation is mainly controlled by the  $k_{\text{on}}$  rate at the barbed end, which is  $11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  for free barbed ends (25); in the presence of the mouse formin mDia1, the  $k_{\text{on}}$  is  $\sim 4\times$  larger (26). When the barbed end is bound to a leaky capper, such as a processive formin like mDia1, the free energy associated to actin monomer insertion at the capped end, balances the work of the tangent force over a distance of one actin monomer size (27). Therefore, the actual  $k_{\text{on}}$  rate is modified according to

$$\left(\frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{on},0}}\right) = \exp\left(-\frac{\tilde{\mathbf{N}} \cdot \mathbf{d}_3}{k_B T}d\right), \quad (4)$$

where  $k_{\text{on},0}$  is the on-rate of free barbed end (17,27). In the above expression, the force  $\tilde{\mathbf{N}}$  and the tangent vector  $\mathbf{d}_3$  are expressed at the barbed end of the actin filament;  $d$  is the radius of one actin monomer. At the onset of buckling, the ratio ( $k_{\text{on}}/k_{\text{on},0}$ ) is low and eventually reaches unity for large  $L$ , when the force imposed to the actin filament is weak (Fig. 3). In this latter case, the elongation rate is almost as fast as an actin filament with a free barbed end.

At intermediate contour lengths, the orientation of the actin filament end changes (BC1 and BC2 conditions, Fig. 2, A or B). In consequence, the barbed end experiences a transition from compression, when the force pushes the end against the formin, to extension, when the actin filament is pulled away from the surface. In the latter case, actin filament elongation becomes independent of the mechanical stress and is only limited by diffusion of actin monomer (Fig. 3, conditions BC1–2). In contrast, the BC3 condition cannot sustain such an acceleration of the elongation rate, because both tangents are fixed and the force remains compressive for all configurations.

The configurations adopted by a single actin filament during elongation provide a direct way to measure the buckling force (Appendix C). The solution of Eq. 1 com-

pares well with the force magnitude determined from pooled experiments that correspond to different actin filament lengths and end-to-end distances (Fig. 4). Note also that the model is valid throughout the elongation period and accounts for both the initial and final phases.

### Actin concentration and force at initial buckling

The energy necessary to buckle an actin filament is supplied by the addition of actin monomers at the formin-associated barbed end. The presence of an obstacle at the barbed end slows polymerization and actin filament elongation as

$$\frac{k_{\text{on,Formin}}}{k_{\text{on,FreeEnd}}} = \exp\left(-\frac{A}{a^2}\right),$$

where we adapt Eq. 4 to BC1 ( $A = \pi^2 L_p d$ , Eq. B-3), BC2 ( $A = \xi_1^2 L_p d$ , Eq. B-4) or BC3 conditions ( $A = 4\pi^2 L_p d$ , Eq. B-5);  $d$  is the fluctuation of the actin filament position allowing insertion of one actin monomer. If the off-rate is unaffected by the presence of the constraint, the minimal actin monomer concentration necessary to sustain buckling is

$$[\text{Actin}]_{\text{Buckling}} = \exp\left(\frac{A}{a^2}\right)[\text{Actin}]_{\text{Critical}},$$

where  $[\text{Actin}]_{\text{Critical}}$  is the critical concentration at the barbed end of an actin filament in absence of any obstacle ( $\sim 0.1 \mu\text{M}$ , (25)). This relationship predicts the minimal end-to-end distance as a function of the actin concentration present near the barbed end. For a concentration of  $1 \mu\text{M}$  actin monomer, buckling is possible above  $0.3 \mu\text{m}$  (BC1),  $0.45 \mu\text{m}$  (BC2), or  $0.7 \mu\text{m}$  (BC3) (Fig. 5 B); larger concentration ( $50 \mu\text{M}$  actin monomer) does not significantly move this minimum ( $0.2 \mu\text{m}$  for BC1,  $0.25 \mu\text{m}$  for BC2, and  $0.4 \mu\text{m}$  for BC3; Fig. 5 B).

The model predicts that single actin filaments can produce buckling forces in the range of  $5\text{--}10$  pN (Fig. 5 A, end-to-end  $< 0.5 \mu\text{m}$ ). Moreover, this figure illustrates the significance of actin concentration, boundary conditions, and the distance between actin filament ends in buckling force. BC1 condition is associated with very loose connections between the actin

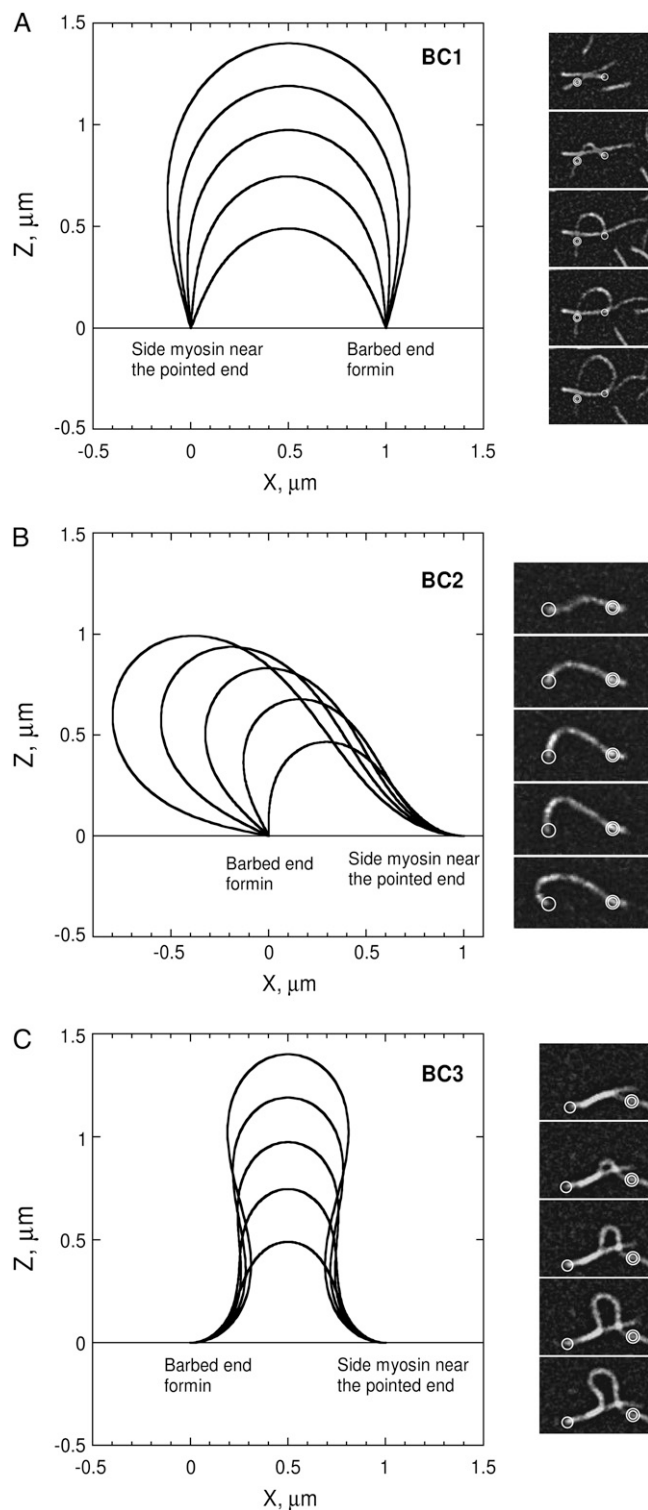


FIGURE 2 Side-by-side comparison of experimental and modeled actin filaments buckling configurations. Typical buckled configurations, calculated for boundary conditions of type 1 (BC1, *A*, left column), boundary conditions of type 2 (BC2, *B*, left column), and boundary conditions of type 3 (BC3, *C*, left column), are compared to their experimental counterpart. (*A–C*, right column) Time-lapse evanescent wave fluorescence microscopy of profilin/rhodamine actin polymerization in the presence of formin (single circle) and NEM-myosin II (double circle) attached to the coverglass.

filament and the cover glass; conversely, BC2, and even more BC3, represents tight constraint, because one or two ends have fixed directions. Therefore, for identical end-to-end distance, buckling with BC3 produces larger force than the one associated to BC2 or BC1 (Fig. 5 *b*).

### Model for filament-surface junction

Bond robustness between the formin and the coverglass might limit the actual force developed by the actin filament, in particular, at short end-to-end distance and contour length (Fig. 5 *A*). To better understand the force transmission between the actin filament and the surface, we modeled the bond as a spring (Fig. 1, *inset*, and Appendix D). The equations remain unchanged (Eq. 1), but the condition for the rod position at  $s = 0$  now gives the balance between the internal force developed by the actin filament and the spring extension (Eq. D-2)

$$\mu \mathbf{r}(0) + \mathbf{N} = 0, \quad (5)$$

where  $\mu$  is proportional to the spring stiffness. Note that in condition BC3, both actin filament ends have fixed horizontal directions; thus, any relative displacement between the filament end and the surface is impossible. Therefore, we examine the consequences of Eq. 5 for BC1 or BC2 conditions only. We focus on the critical stiffness,  $\mu_c$ , necessary to hold the filament end at a distance  $\Delta$  from the surface (Fig. 6). Both BC2 and BC1 requires large bond robustness, in the range  $0.2\text{--}1.2\text{ pN nm}^{-1}$ , when the end-to-end distance is about equal to the observation limit in TIRF (Fig. 6); conversely,  $\mu_c$  goes under  $0.2\text{ pN nm}^{-1}$  for long filaments (above  $1.5\text{ }\mu\text{m}$ , all combinations of  $\Delta$  and boundary conditions). The bond stiffness necessary to maintain the actin filament ends close to the microscope slide becomes very large, as shown in Fig. 6, for an end-to-end distance below  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ .

### DISCUSSION

We have used a mechanical model for elastic rods, based on the equilibrium of forces and moments, to analyze single actin filament buckling events in vitro. Besides its simplicity, the model depends on a unique parameter, the persistence length for actin filaments, which ranges from 10 to  $15\text{ }\mu\text{m}$  (28–30). With the help of the model, we can determine the role of external constraints imposed to actin filament, measure the forces, and predict the actin level necessary to develop forces against the mechanical constraints imposed at both filaments ends.

Images were taken every 15 s. All model configurations in panels *A–C* correspond to an end-to-end distance of  $1\text{ }\mu\text{m}$  and contour lengths ranging from  $1.5$  to  $3.5\text{ }\mu\text{m}$ . Right column in panel *a* shows experimental buckling with freely rotating ends (BC1 conditions, end-to-end distance of  $3\text{ }\mu\text{m}$ ). In panel *B*, only the left end rotates (BC2 conditions, end-to-end distance of  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) whereas panel *C* illustrates buckling with fixed horizontal tangent at both ends (BC3 conditions, end-to-end distance of  $2\text{ }\mu\text{m}$ ).

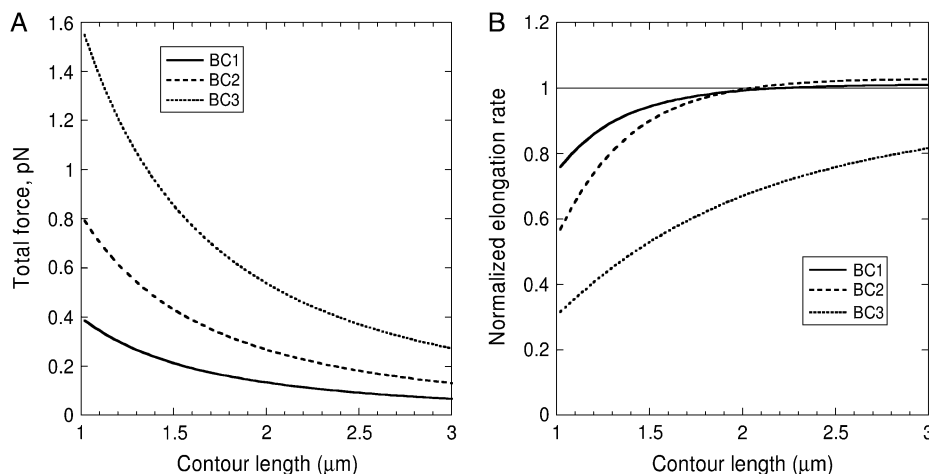


FIGURE 3 Force-contour length relation. (A) The force (boundary conditions BC1, BC2, and BC3, end-to-end distance of  $1 \mu\text{m}$ ) is maximal at short filament length, when the rod configuration is almost straight and eventually becomes weaker for longer filaments. (B) The normalized elongation rate, corresponding to curves in panel A (reference is elongation of the free barbed end), is shown as a function of the contour length. For BC1 and BC2 conditions, the tangent force exerted on the filament ends shifts from pushing against an obstacle ( $L < 2 \mu\text{m}$ , B) to pulling away from the attachment point ( $L > 2 \mu\text{m}$ ). Conversely, in BC3 conditions, the tangent force pushes the filament against the surface along constant directions and, therefore, the normalized elongation rate is always bounded by 1. We used  $L_p = 15 \mu\text{m}$  and end-to-end distance of  $1 \mu\text{m}$ .

The solution of Eq. 1 depends only on the ratio of the end-to-end distance over the contour length,  $a/L$ , and on the conditions specifying the position and the orientation of the actin filament ends. The filament end positions are fixed in space (see Eq. 2, in the text). The orientation of the filament at its ends, which is the decisive factor in the determination of actin filament configuration, is given by a limited number of cases listed in Eq. 3. Boundary conditions 1 and 2 give the

possibility to the filament end to change its direction in the course of elongation, as shown in Fig. 2, A (both ends) or B (left end). Conversely, in boundary conditions 2 and 3, we can also fix the value of the angle between the filament direction and the horizontal axis, as illustrated in Fig. 2, B (right end) or C (both ends).

### Effect of actin filament configuration to force generation

Solutions of Eq. 1 associated with one of the boundary conditions BC1, 2, or 3 account satisfactorily for all configurations found in vitro. We observed the correlation between the type of boundary condition (BC1–BC3) and the magnitude of the force produced by the actin filament during buckling (Figs. 2, 3, and 5). If the vector tangent to the actin filament end can change its orientation, the case of boundary condition BC1 (Fig. 2 A), the buckling force is always smaller than the force developed under other conditions (BC2 or BC3). These two latter cases correspond to important constraints because the vector tangent to the actin filament centerline at one or both ends has a fixed direction.

The model helps us to trace the variety of actin filament configurations to the tightness of the connections between the actin filament and the formin or the myosin. For example, a single bond between the formin-associated filament end and the microscope slide allows freedom for the end to change its direction and corresponds to boundary conditions of type 1 or 2 in the model. Conversely, multiple attachment points along the side of the filament via NEM myosin II amount to maintain the vector tangent to the filament extremity in a fixed direction. This situation is the analog of boundary conditions 2 or 3 in the simulations.

To derive force-filament length relations, we used a persistence length of  $15 \mu\text{m}$  and an end-to-end distance of

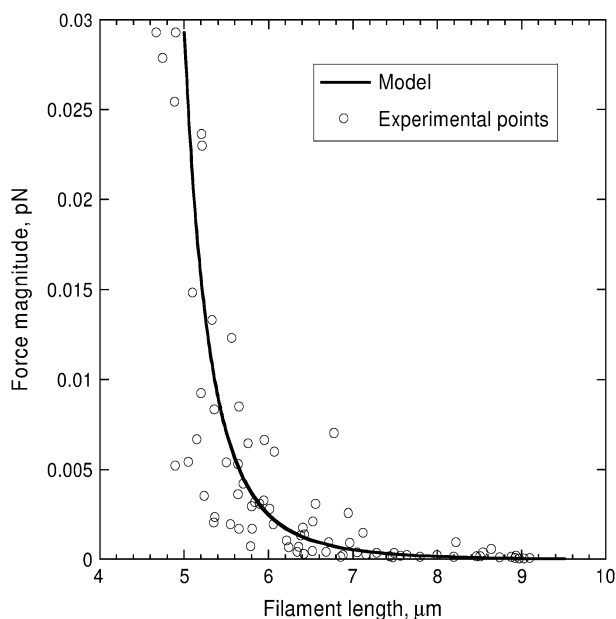


FIGURE 4 Experimental buckling and model validation. From 113 pooled filament contours (Fig. 3, A and B, in D. Kovar and T. Pollard (13) and unpublished data), we determined the force magnitude as solution of the moment balance equation with BC1 conditions and  $L_p = 15 \mu\text{m}$  (Appendix C). The end-to-end distance is  $\sim 5 \mu\text{m}$  for all data; filament length is in the range 5–12  $\mu\text{m}$  at the end of the elongation period.

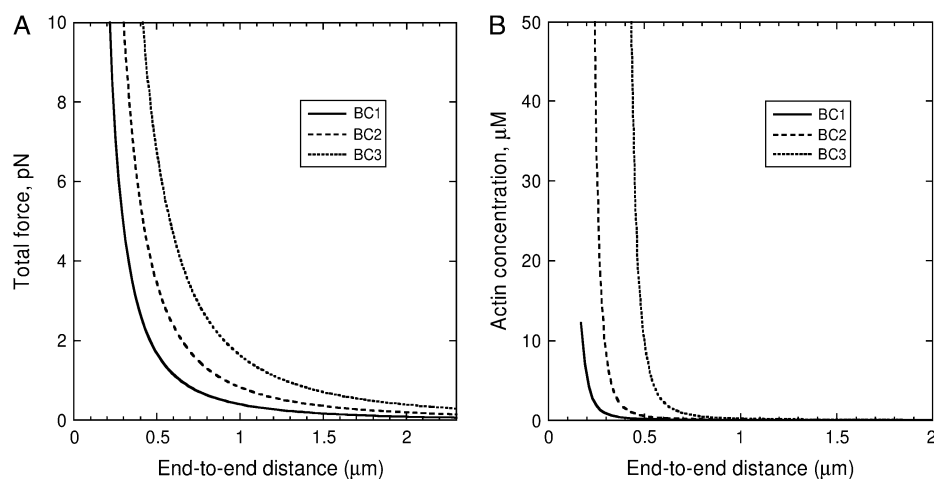


FIGURE 5 Actin concentration and force at onset buckling. The force (A) and the actin concentration (B) are plotted against the end-to-end distance, for different attachment conditions (BC1, solid line; BC2, dashed line; BC3, dotted line). We use  $L_p = 15 \mu\text{m}$ . To appreciate the role of actin in the buckling of short filaments, note that the critical actin monomer concentration for the free barbed end is  $0.1 \mu\text{M}$ .

$1 \mu\text{m}$ . For actin filament contour length just above the end-to-end distance the force is maximal and crucially depends on the kind of boundary condition at the actin filament ends: free rotation gives rise to gentle stress ( $\sim 0.4 \text{ pN}$ ). If one of the tangents is held fixed, the force is doubled ( $\sim 0.8 \text{ pN}$ ) and rises to  $1.6 \text{ pN}$  when both tangents are constrained. For shorter end-to-end distance, the force becomes important:

single filaments can produce up to  $10 \text{ pN}$  for  $a \leq 0.5 \mu\text{m}$  (Fig. 5 A).

We bring out a direct validation of Eq. 1 by confronting a modified version of the moment balance equation and reconstructed geometrical configurations of the actin filaments at different buckling stages (Fig. 4). In addition, Fig. 4 indicates that force fluctuations do not have an important part: the first harmonic of the buckled configuration is sufficient to account for the observations (discussion in Appendix A). For large filament length and end-to-end distance, the buckling force is only a fraction of  $\text{pN}$  (Fig. 4), in agreement with the linear theory for filament buckling (Eq. B-2).

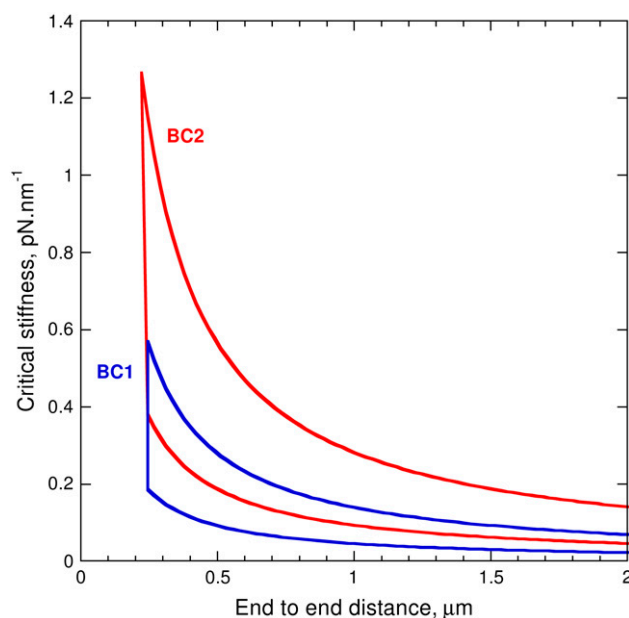


FIGURE 6 Critical bond stiffness. We determine the conditions necessary to hold the filament ends at a distance  $\Delta$  from the surface for different end-to-end ( $a$ ) and contour length ( $L$ );  $a$  is the control parameter and  $L$  is given by  $L/a = 1.1$ ;  $L_p = 15 \mu\text{m}$ ;  $\Delta$  is chosen in the range  $3\text{--}9 \text{ nm}$ , i.e., the typical size of one actin monomer ( $\sim 6 \text{ nm}$ ). The curvilinear domain with blue (red) boundaries gives the bond stiffness compatible with the constraint  $3 \text{ nm} < \Delta < 9 \text{ nm}$  for conditions BC1 (BC2). For both kind of boundary conditions, the top (respectively, bottom) border, indicated by red and blue squares, is associated with  $\Delta = 3 \text{ nm}$  ( $\Delta = 9 \text{ nm}$ , red and blue dots). The vertical borders, indicated by blue and red triangles, are determined by the condition  $L_c < L$  (Eqs. D-3 and D-4); below this limit, no buckling occurs, whatever the bond robustness.

### Conditions for actin concentration, bond stiffness, and buckling formation

It has been suggested that insertion of actin monomers at the barbed end is limited by the presence of forces or loads (27). However, this is not a limiting factor, since  $1 \mu\text{M}$  of actin is sufficient to initiate buckling for a wide range of end-to-end distances above  $0.5 \mu\text{m}$  (all boundary conditions). For actin filaments initially shorter than  $0.5 \mu\text{m}$ , the actin monomer concentration required for efficient polymerization increases abruptly. Due to the predicted high force ( $\sim 10 \text{ pN}$ , Fig. 5, BC1–3 conditions) that constrains actin filament ends, it is necessary to have up to  $50 \mu\text{M}$  of free actin monomers to elongate and efficiently deform actin filaments of  $0.2 \mu\text{m}$ , (BC1 conditions). Although we cannot entirely rule out the possibility that the actin monomer supply is limiting for elongation of short actin filaments under constraint in vivo, the proximity of deformable structure (i.e., the cell membrane) near the site of nucleation allow us to predict that in most cases actin monomers concentration in vivo will be high enough to limit steric capping.

We modeled the interactions between the filament and the surface as a spring of stiffness  $\mu$ . In the absence of data for this parameter, we constrained the model by requiring that both actin filament ends remains at a distance  $\Delta$  from the surface;  $\Delta$  is chosen in the range  $3\text{--}9 \text{ nm}$ , i.e., approximately

the size of one actin monomer. We can compare the values for bond stiffness  $\mu$  (Fig. 6) to the stiffness or chemical bonds in similar systems. Ishijima et al. (31) determined that the stiffness of the myosin head is in the range 0.14–0.28 pN nm<sup>-1</sup>; a value of  $\sim 0.69$  pN nm<sup>-1</sup> was reported for the stiffness of the acto-myosin cross-bridges during movement (32). Therefore, the predicted stiffness, in the range 0.2–1.2 pN nm<sup>-1</sup> (Fig. 6), is compatible with the experimental values obtained in similar systems (acto-myosin cables). In consequence, actin monomer concentration and the bond stiffness necessary to observe buckling would not constitute a limitation for model predictions applied to *in vivo* situations.

### Implication of the model for force generation *in vivo*

Formin-driven (re)arrangement of the actin cytoskeleton is essential to initiate new cell compartments (filopodia, yeast buds), to establish cell polarity before division, to assemble the cytokinetic contractile ring and to regulate cell-cell or cell-surface interactions during adhesion and motility (12). All these cellular processes require the right combination (in space and time) of chemical and physical factors operating within a cell of cellular compartment, including: filament size, actin monomers concentration, boundary conditions, and bond stiffness. Although our modeling approach is motivated by experiments in reconstituted systems, we can extend our results to *in vivo* conditions.

We have shown that over a wide range of conditions, a single filament can develop forces to move the membrane and/or organize the cell cytoskeleton. The buckling force per single filament can counterpoise resistance up to  $\sim 10$  pN (Fig. 5 A), which is on the order of magnitude of the force measured in thin highly curved structures such as experimentally driven tethers (33). In addition, our study shows that this deformation requires a high but plausible concentration of free actin monomers ( $\sim 10$ – $50$   $\mu$ M, Fig. 5 A) and a bond stiffness in the range 0.1–0.5 pN nm<sup>-1</sup> (Fig. 6). Therefore, these two factors are not limiting in the generation of large forces at the cell scale level.

From Fig. 5, we can extrapolate the role of short actin filaments *in vivo*. A single actin filament is able to develop a force  $\sim 10$  pN only in a prebuckling state whereas its length remains relatively short ( $< 0.5$   $\mu$ m). As illustrated in Figs. 5 and 6, prebuckling occurs when both actin filament ends are trapped by adjacent molecular complexes in the cell. Therefore, it is important to examine the different physical or molecular mechanisms keeping the filament configuration (its orientation and its length) in a prebuckled state. We will examine the consequences of two possibilities for controlling filament configuration by: a), severing filaments; or b), cross-linking filaments together.

Severing of filaments by ADF/cofilin could provide ways to expand the population in the prebuckling stage at the expense of long and old filaments. Experiments demonstrate that ADF/cofilin utilizes the mechanical properties of fila-

ments to bind them before severing (34). Therefore, because the mechanical stress experienced by filaments during elongation is rapidly decreasing after the onset of buckling (Fig. 3), ADF/cofilin could use this differential property to bind preferentially to postbuckled filaments, whose mechanical stress is the lowest. After severing, only actin filaments in the prebuckling stage and of short contour length would survive while their turnover is maintained at a high rate.

Cross-linking proteins (e.g., fascin or  $\alpha$ -actinin) and the Arp2/3 complex are extremely important for actin filament formation or actin cytoskeleton growth. In the presence of high cross-linking or branching activity, the size of the filament piece between the free barbed end and the first cross-link would be well below 1  $\mu$ m while it lengthens rapidly by polymerization. Therefore, these short filaments are permanently kept in a prebuckling state and could provide a large part of the total force developed by actin filaments for cell deformation or lamellipodia progression.

Finally, we also hypothesize that the mechanical stress developed by growing actin filaments could represent a new way to convey information in the cell and achieve organization of the cytoskeleton. It is well accepted that information driving actin filament nucleation and elongation flows from external signaling molecules to their intracellular targets, via actin regulators at the membrane, including WASP, formins or the complex Arp2/3. However, the type of boundary conditions experienced by actin filament depends on the interactions between the filament end and the activator complex at the membrane. Therefore, if the force developed during filament elongation becomes large, it could, in turn, modify the molecular organization of the sites where actin filament nucleation and elongation occur. Our study illustrates the possibility that, in addition to on and off chemical switches, mechanical stress could take part in the self-organization of the cell cytoskeleton during movement by direct activation and/or inhibition of actin polymerization.

### APPENDIX A: MECHANICAL EQUILIBRIUM EQUATIONS FOR A CONSTRAINED ROD

We use the Kirchhoff equations for elastic rods to model actin filaments, which are assumed inextensible and isotropic (24). The rod position (Fig. 1 A) is defined by a vector function

$$s \mapsto \mathbf{r}(s), \quad 0 \leq s \leq L,$$

where  $s$  is the arclength of the rod centerline and  $L$  the total filament length. The local orientation of the filament is given by a set of two orthonormal vectors,  $(\mathbf{d}_1(s), \mathbf{d}_3(s))$ ;  $\mathbf{d}_1(s)$  is aligned with the principal flexure axis of the rod and prescribes the orientation of the cross section at  $s$ . The tangent vector to the rod centerline, denoted  $\mathbf{d}_2(s)$ , lines up with the torsion axis.  $\mathbf{d}_3$  is obtained by derivation of the rod position  $\mathbf{r}(s)$  with respect to arclength  $s$

$$\mathbf{d}_3 = \frac{d\mathbf{r}}{ds}.$$

Actin filaments are observed in the field of an evanescent wave ( $< 500$  nm) so that the rod remains in a plane during elongation. Moreover, as suggested

by experimental evidences showing no accumulation of filament torsion along its centerline (Fig. 3 *g* in Kovar and Pollard (13)), the actin filament does not suffer out-of-plane deformation (Zajac phenomenon, (35)). Therefore, we demand that  $(\mathbf{r}, \mathbf{d}_1, \mathbf{d}_3)$  be in a plane spanned by a set of two, constant, orthonormal vectors  $(\mathbf{e}_1, \mathbf{e}_3)$ . Additionally, we assume that the end-to-end vector is along the horizontal axis

$$\mathbf{r}(L) = \mathbf{r}(0) + a\mathbf{e}_1,$$

where  $a$  is the end-to-end distance and  $a\mathbf{e}_1$  the end-to-end vector (Table 1). Let  $\theta(s)$  be the angle between  $\mathbf{d}_3$  and  $\mathbf{e}_1$ . The vectors associated with filament position and orientation are

$$\begin{aligned}\mathbf{r}(s) &= x(s)\mathbf{e}_1 + z(s)\mathbf{e}_3, \\ \mathbf{d}_3(s) &= \cos\theta(s)\mathbf{e}_1 + \sin\theta(s)\mathbf{e}_3, \\ \mathbf{d}_1(s) &= \sin\theta(s)\mathbf{e}_1 - \cos\theta(s)\mathbf{e}_3.\end{aligned}$$

To find model equations and boundary conditions, we start from the Lagrangian of the system, including contributions arising from the elastic energy stored in filament flexure, the inextensibility constraint and attachment conditions. The total elastic energy is

$$E_1 = \frac{\kappa}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds,$$

where  $\kappa$  is the bending modulus of the rod, related to the persistence length,  $L_p$ , through  $\kappa = L_p k_B T$ ;  $k_B$  and  $T$  are the Boltzmann constant and absolute temperature (Table 1). The internal force in the rod,  $\tilde{\mathbf{N}}$ , ensures inextensibility so that  $s$  is the arclength for all configurations. Therefore, any departure from equation  $d\mathbf{r}/ds = \mathbf{d}_3$  contributes to change the potential energy by

$$E_2 = - \int_0^L \tilde{\mathbf{N}} \cdot \left( \frac{d\mathbf{r}}{ds} - \mathbf{d}_3 \right) ds.$$

The physical interpretation of the term  $\int_0^L \tilde{\mathbf{N}} \cdot \mathbf{d}_3 ds$  in  $E_2$  is a potential energy associated with a load applied to filament ends. Finally, the surface reaction  $\tilde{\mathbf{u}}_0$  (respectively  $\tilde{\mathbf{u}}_L$ ) at  $s = 0$  (respectively  $L$ ) is included via terms for the energetic contribution of  $\tilde{\mathbf{N}}$  at  $s = 0$  or  $L$

$$E_3 = \tilde{\mathbf{u}}_0 \cdot \mathbf{r}(0) + \tilde{\mathbf{u}}_L \cdot (\mathbf{r}(L) - a\mathbf{e}_1)$$

Therefore,

$$\tilde{L}_G = -E_1 - E_2 + E_3,$$

is the Lagrangian function, which, after normalization by  $k_B T$ , reads

$$\begin{aligned}L_G = \left( \frac{\tilde{L}_G}{k_B T} \right) &= -\frac{L_p}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds + \int_0^L \mathbf{N} \cdot \left( \frac{d\mathbf{r}}{ds} - \mathbf{d}_3 \right) ds \\ &+ \mathbf{u}_0 \cdot \mathbf{r}(0) + \mathbf{u}_L \cdot (\mathbf{r}(L) - a\mathbf{e}_1),\end{aligned}\tag{A-1}$$

with  $\mathbf{N} = \tilde{\mathbf{N}}(k_B T)^{-1}$ ,  $\mathbf{u}_{0,L} = \tilde{\mathbf{u}}_{0,L}(k_B T)^{-1}$ . The variation of  $L_G$  results into Euler-Lagrange equations

$$\begin{aligned}L_p \frac{d^2\theta}{ds^2} &= -N_1 \sin\theta + N_3 \cos\theta, \\ \frac{d\mathbf{N}}{ds} &= 0, \\ \frac{dx}{ds} &= \cos\theta, \\ \frac{dz}{ds} &= \sin\theta,\end{aligned}\tag{A-2}$$

and boundary terms

$$\mathbf{u}_0 - \mathbf{N} = 0,$$

$$\mathbf{u}_L + \mathbf{N} = 0.$$

The first equation in Eq. A-2 represents the balance between the bending moment and the constraints exerted by the fixed-rod end conditions. From the second equation, we note that the buckling force,  $\mathbf{N}$ , is constant along the filament centerline. Finally, the second and third equations give the filament position. The unknown force components,  $N_1$  and  $N_3$ , which are determined as part of the solution of (Eq. A-2), depend on the boundary conditions used for  $\theta$ ,  $x$ , and  $z$ . They give the surface reaction exerted on the rod during buckling ( $\mathbf{u}_0$  and  $\mathbf{u}_L$ ) and, consequently, the force exerted by the elongating filament on its ends. The boundary conditions for filament ends come as

$$\begin{aligned}x(0) &= 0, & z(0) &= 0, \\ x(L) &= a, & z(L) &= 0.\end{aligned}$$

We supplement these constraints by one condition for the angle  $\theta$  chosen in the list

$$\begin{aligned}\text{BC1 : } & \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0} = 0, & \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=L} &= 0, \\ \text{BC2 : } & \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0} = 0, & \theta(L) &= 0, \\ \text{BC3 : } & \theta(0) = 0, & \theta(L) &= 0.\end{aligned}$$

The boundary conditions of type 1, 2, or 3 (BC1–3) refer to different behavior of the filament orientation at  $s = 0$  or  $L$ . Nonlinear Eq. A-2 admit multiple solutions depending on resonance arising from the constraints on rod ends and boundary conditions BC1–3. Also, note that these nonlinear equations are valid for arbitrary large deviations of the tangent vector from the horizontal baseline, to the contrary of the fourth-order linear differential system classically used in models for semirigid polymers.

In the limit of slightly bent rods,  $x(s)$  approximates  $s$  and  $\theta(s)$  equals the slope of  $z(s)$  (as function of  $x(s)$ ). From Eq. A-2, one recovers the classical fourth-order differential linear equation valid for small amplitude bending solution

$$L_p \frac{d^4 z}{dx^4} + N_1 \frac{d^2 z}{dx^2} = 0.$$

## Time relaxation constant for almost straight filaments

The hydrodynamics of actin filaments is controlled by fluid viscosity due to its low Reynolds number and can be modeled via drag forces distributed along the filament. However, we used a model without friction terms (see Eq. A-2), because relaxation to equilibrium is fast. To check the validity of this assumption, we look at the stability of the solutions of Eq. A-2 in the limit of almost straight configurations. The angle  $\theta$ , which is function of space and time, obeys

$$L_p \frac{\partial^4 \theta}{\partial s^4} + N_1 \frac{\partial^2 \theta}{\partial s^2} = - \left( \frac{c}{k_B T} \right) \frac{\partial \theta}{\partial t}.\tag{A-3}$$

In the above equation,  $c$  is the orthogonal drag coefficient for a filament moving at a constant altitude,  $h$ , near a planar surface (36)

$$c = \frac{4\pi\eta}{\ln\left(\frac{2h}{r}\right)},$$

where  $\eta$  is the fluid viscosity and  $r$  the filament radius. Solution of Eq. A-3, supplemented with four boundary conditions  $(\partial\theta/\partial s)_{s=0,L} = 0$ ,  $\int_0^L \theta ds \approx z(L) = 0$ ,  $\theta(0) = \theta(L)$ , yields the relaxation time

$$\tau_k = \frac{c}{L_p k_B T} \left( \frac{L}{2k\pi} \right)^4,$$



where  $k$  is a positive integer. Using  $\eta = 0.07$  Pa s,  $h = 500$  nm (approximately the depth of the evanescent wave),  $r = 4$  nm, and  $L$  in the interval  $0.2\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$ , we found that  $\tau_1$  ranges from 0.003 to 1.7 ms. ( $L_p = 15\text{ }\mu\text{m}$ ). Therefore, this result proves that relaxation to equilibrium is very fast and the equilibrium Eq. A-2 account for the buckling of actin filaments. Note that the actin filament length  $L$  has the role of a pseudotime coding for the actin filament age.

### Model validity

In this study, we assume that filament shape fluctuations are negligible and a deterministic description of actin filament bending accounts for in vitro experiments and in vivo observations. We discuss the validity of this assumption with respect to fluctuation of thermal origin.

On the one hand, the existence of multiple bending modes, solution of Eq. A-2, raises the possibility of rapid, noise-induced, transitions between them. We use the partition function,  $Z$ , which gives the number of configurations for semirigid polymers constrained by a constant end-to-end distance (37) to estimate the statistical distribution of filaments during elongation.  $Z$  depends only on three parameters, the filament contour length ( $L$ ), the end-to-end distance ( $a$ ), and the persistence length ( $L_p$ ). If we keep  $a$  and  $L_p$  constant and vary  $L$ , >99% of the distribution is concentrated in the interval  $a \leq L \leq a + 10d$ , where  $d$  is the typical diameter of one actin monomer ( $\sim 6$  nm); this conclusion is valid for all values of  $L_p$  ranging from 10 to  $15\text{ }\mu\text{m}$ . Thus, for  $a/L$  ratio below 0.95 (or, equivalently,  $L > a + 10d$ ), the number of rod configurations compatible with the constraints is extremely low. In consequence, the most probable filament shape corresponds to the one with the lowest energy level. On the other hand, the physics of semiflexible polymers predicts a rigid-to-flexible transition at high  $L/L_p$  ratio ( $\sim 2.85\text{--}3$ ) (38). This implies a second limit, for large  $L$ , above which the configuration of very long actin filament ( $\sim 30\text{--}45\text{ }\mu\text{m}$ ) cannot be accounted for by our approach. If we combine these two bounds, we see that model validity is limited to the interval  $(a/0.95) \leq L \leq 2L_p$ .

In actin polymerization experiments followed by evanescent wave microscopy (13), buckling is observed for end-to-end distances as short as  $0.7\text{ }\mu\text{m}$  up to a final length of  $\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ , hence,  $L/L_p$  ranges from 0.05 at beginning to  $\sim 0.6$ , when elongation stops ( $L_p = 15\text{ }\mu\text{m}$ ). Moreover, when incorporation of monomers into actin filaments is fast (26), the ratio  $a/L$  decreases rapidly below 0.95. Therefore, the experimental bounds for  $L$  are compatible with the use of a simple, deterministic model based on the mechanics of elastic rods.

## APPENDIX B: DETERMINATION OF THE FORCE MAGNITUDE AT INITIAL BUCKLING

We derive an expression for  $\theta$  and the internal force components, solution of Eq. A-2, in the case of a slightly bent rod, when the contour length is just above the end-to-end distance. Thus, we limit our search to solutions of Eq. A-2 with small amplitude: the variables  $(\theta(s), N(s))$  will be function of the “small” parameter  $\delta = 1 - a/L$ , when  $L \sim a$ .

### BC1 conditions

A direct integration of Eq. A-2, using boundary conditions for the rod ends (Eq. 2) and BC1, gives

$$\begin{aligned} L_p \left( \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=L} - \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0} \right) &= -N_1 \int_0^L \sin\theta ds + N_3 \int_0^L \cos\theta ds \\ &\Rightarrow \\ 0 &= -N_1(z(L) - z(0)) \\ &\quad + N_3(x(L) - x(0)) \\ &\Rightarrow \\ 0 &= aN_3. \end{aligned}$$

Because the end-to-end distance is nonzero,  $N_3$  vanishes identically: the vertical force is zero. The linearized equation for  $\theta(s)$

$$L_p \frac{d^2\theta}{ds^2} = -N_1\theta \quad (\text{B-1})$$

has solutions of the form

$$\theta_k(s) = A_k \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right), \quad N_1 = \left(\frac{k\pi}{L}\right)^2 L_p, \quad N_3 = 0, \quad (\text{B-2})$$

where  $k$  is an integer; at this stage, the amplitudes  $A_k$  are arbitrary. The total extension  $x(L)$  is obtained by direct integration of equation

$$\frac{dx}{ds} = \cos\theta(s) \approx 1 - \frac{1}{2} \left( A_k \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right) \right)^2,$$

which implies

$$x(L) = L - \frac{L}{4} A_k^2. \quad (\text{B-3})$$

Using the boundary condition  $x(L) = a$ , we obtain a relation between the unknown amplitudes  $A_k$  and  $\delta$

$$A_k^2 = 4 \left( 1 - \frac{a}{L} \right) = 4\delta,$$

Because the condition  $z(L) = 0$  is  $O(\delta^3)$ , it is automatically fulfilled at  $O(\delta)$ . The amplitude of the first buckling mode increases with  $L$  as

$$A_1 = 2 \sqrt{\left( 1 - \frac{a}{L} \right)} = 2\delta^{1/2}.$$

### BC2 conditions

Because boundary conditions BC2 are asymmetric, both components of the internal force are nonzero. The small amplitude solution for  $\theta(s)$  reads

$$\theta(s) = \left( \frac{N_3}{N_1 \cos(\xi)} \right) \left( \cos(\xi) - \cos\left(\frac{s}{L}\right) \right),$$

where  $\xi$  is solution of

$$\tan(\xi) = \xi, \quad \xi > 0.$$

The solutions of the above equation begins with  $\{4.493\cdots, 10.904\cdots, 17.220\cdots\}$  and are asymptotically given by  $\xi_k = (2(2k-1)+1)\pi/2$  for large integer  $k$ . From conditions  $x(L) = a$ ,  $z(L) = 0$ , and assuming that  $N_3$  is of order  $O(\delta^{1/2})$ , one can check that

$$\begin{aligned} N_1 &= \left( \frac{\xi_k}{L} \right)^2 L_p, \\ N_3 &= 2 \frac{\xi_k L_p}{L^2} \delta^{1/2}, \\ \theta(s) &= \frac{2}{\xi_k \cos(\xi_k)} \left( \cos(\xi_k) - \cos\left(\frac{s}{L}\right) \right) \delta^{1/2}, \end{aligned} \quad (\text{B-4})$$

is solution of Eq. A-2 with BC2 conditions and  $\tan(\xi_k) = \xi_k$ .

### BC3 conditions

The last case, BC3, can be treated in a similar way. Because boundary conditions are symmetric ( $\theta$  is zero at both ends), the component  $N_3$  vanishes and we are left with

$$\begin{aligned}
 N_1 &= \left( \frac{2k\pi}{L} \right)^2 L_p, \\
 N_3 &= 0, \\
 \theta(s) &= 2\sin\left(2k\pi\frac{s}{L}\right)\delta^{1/2}.
 \end{aligned} \tag{B-5}$$

Note that the condition  $z(L) = 0$  selects even harmonic solutions. If we impose nonhorizontal tangents (i.e.,  $\theta(0) \neq 0, \theta(L) \neq 0$ ),  $N_3$  is generally nonzero, unless  $\theta(0) + \theta(L) = 0$ .

### APPENDIX C: ESTIMATION OF THE FORCE MAGNITUDE FROM FILAMENT CONFIGURATION

Integrating Eq. A-2 twice with respect to  $s$  and using conditions BC1, we show that the moment balance is a relation between  $\theta$  and the rod position

$$L_p(\theta(s) - \theta(0)) + N_1 \left( \int_0^s x(u) du \right) - N_3 \left( \int_0^s z(u) du \right) = 0. \tag{C-1}$$

with constant coefficients  $L_p$ ,  $N_1$ , and  $N_3$ . If we express the relation (Eq. C-1) at  $n$  points of abscissas  $s_i$ , ( $i = 1, \dots, n$ ) along a particular filament, we obtain a linear system of  $(n - 1)$  equations and two unknown coefficients  $N_1$  and  $N_3$

$$\mathbf{M}\mathbf{x} = 0, \tag{C-2}$$

with

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} L_p(\theta_2 - \theta_1) & X_2 & -Z_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ L_p(\theta_i - \theta_1) & X_i & -Z_i \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ L_p(\theta_n - \theta_1) & X_n & -Z_n \end{pmatrix}, \quad \mathbf{x} = \begin{pmatrix} 1 \\ N_1 \\ N_3 \end{pmatrix},$$

where  $\theta_i = \theta(s_i)$ ,  $X_i = \int_{s_1}^{s_i} x(u) du$ , and  $Z_i = \int_{s_1}^{s_i} z(u) du$ . Because the system of linear Eq. C-2 is overdetermined (two unknowns and  $n - 1$  equations), we solve it in the least square sense by minimizing the norm  $|\mathbf{M}\mathbf{x}|$ . Therefore, the solution,  $\mathbf{x}^*$ , is proportional to the eigenvector associated with the minimal eigenvalue of the symmetric  $(3 \times 3)$  matrix  ${}^T\mathbf{M}\mathbf{M}$

$${}^T\mathbf{M}\mathbf{M} = \begin{pmatrix} L_p^2 \left( \sum_{i=2}^n (\theta_i - \theta_0)^2 \right) & L_p \left( \sum_{i=2}^n (\theta_i - \theta_0) X_i \right) & -L_p \left( \sum_{i=2}^n (\theta_i - \theta_0) Z_i \right) \\ \left( \sum_{i=2}^n X_i^2 \right) & & - \left( \sum_{i=2}^n X_i Z_i \right) \\ \left( \sum_{i=2}^n Z_i^2 \right) & & \end{pmatrix}.$$

The coefficients of  ${}^T\mathbf{M}\mathbf{M}$  are determined from the B-spline representation of the functions  $\theta(s)$ ,  $x(s)$ , and  $z(s)$  extracted from a particular filament configuration. After normalization of the solution so that its first component is 1, the force components  $N_1$  and  $N_3$  read off from the second and third component of  $\mathbf{x}^*$ . The form of Eq. C-1 depends on the boundary conditions for  $\theta$  at  $s=0, L$ . Other choices (e.g., conditions BC2 or 3) would give slightly different terms but the linearity of the final equation with respect to the unknown force components is preserved, hence, the procedure to find the actual force from filament configuration remains unchanged.

### APPENDIX D: TRANSITION BETWEEN STRAIGHT AND BUCKLED CONFIGURATIONS

We examine the possibility that one of the rod ends is weakly attached to the formin by a spring, a situation directly relevant to the analysis of the bonds between formin-driven filaments and the cell membrane *in vivo* conditions. To derive the corresponding equations and boundary conditions, we use a slightly modified Lagrangian function (Eq. A-1)

$$\begin{aligned}
 L_S &= -\frac{L_p}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds + \int_0^L \mathbf{N} \cdot \left( \frac{d\mathbf{r}}{ds} - \mathbf{d}_3 \right) ds \\
 &\quad - \frac{\mu}{2} \mathbf{r}(0)^2 + \mathbf{u}_L \cdot (\mathbf{r}(L) - a\mathbf{e}_1),
 \end{aligned} \tag{D-1}$$

where the reaction constraint at  $s = 0$  is replaced by the harmonic potential of a spring of stiffness  $\mu$  (the actual stiffness is  $k_B T \mu$ ). The variation of Eq. D-1 gives equations similar to Eq. A-2 but with different boundary terms

$$\begin{aligned}
 -\mu \mathbf{r}(0) - \mathbf{N} &= 0 \quad \Rightarrow \begin{cases} \mu x(0) + N_1 = 0 \\ \mu z(0) + N_3 = 0 \end{cases} \\
 \mathbf{u}_L + \mathbf{N} &= 0.
 \end{aligned} \tag{D-2}$$

The boundary condition at  $s = 0$  represents the balance between the force due to spring extension  $-\mu \mathbf{r}(0)$  and  $\mathbf{N}$ . We look for small amplitude solutions (BC1 conditions), given by Eq. B-1, and constrained by the condition

$$A_k^2 = 4 \left( 1 - \frac{a}{L} \right) - 4 \left( \frac{k\pi}{L} \right)^2 \frac{L_p}{L\mu}.$$

Real solutions of the above equation exist for  $L$  above a critical length  $L_c$ , solution of

$$\mu(L_c - a) - \left( \frac{k\pi}{L_c} \right)^2 L_p = 0, \tag{D-3}$$

In the interval  $a \leq L \leq L_c$ , the most favorable configuration for filaments corresponds to straight rods; transition to buckling occurs for  $L = L_c$ , when the spring force balances the force of elastic origin, as given by Eq. D-3. Similar analysis for BC2 condition gives the expression for the amplitude and  $L_c$

$$\begin{aligned}
 A_k^2 &= 4 \left( 1 - \frac{a}{L} \right) - 4 \left( \frac{\xi_k}{L} \right)^2 \frac{L_p}{L\mu}, \\
 0 &= \mu(L_c - a) - \left( \frac{\xi_k}{L_c} \right)^2 L_p,
 \end{aligned} \tag{D-4}$$

with  $\xi_k$  is one of the positive solutions of  $\tan(x) = x$  (Eq. B-4).

## Fluctuations of filament length at onset of buckling

Filament undulations, driven by thermal fluctuations, shorten the projected filament length along the end-to-end axis: therefore, the critical length given by conditions (Eqs. D-3 and D-4) can change dramatically. Before buckling, the spring constraint imposed to the filament is loose: the different bending modes are almost independent. Therefore, we use the elastic energy associated to the bending mode  $k$  (unit is  $k_B T$ )

$$E_k = \frac{L_p}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta_k}{ds} \right)^2 ds = \frac{L_p \pi^2}{4L} k^2 A_k^2,$$

to find the second and fourth moments of the fluctuating quantities  $A_k$  by application of the energy equipartition theorem

$$\langle A_k^2 \rangle = \frac{2L}{\pi^2 L_p k^2}, \quad \langle A_{k_1} A_{k_2} \rangle = 0, \quad k_1 \neq k_2,$$

$$\langle A_k^4 \rangle = 3 \langle A_k^2 \rangle^2, \quad \langle A_{k_1}^2 A_{k_2}^2 \rangle = 0, \quad k_1 \neq k_2.$$

From Eq. B-3, which gives the projection of the filament along the horizontal axis, we obtain the average of  $x(0)$  and  $x^2(0)$

$$\begin{aligned} \langle x(0) \rangle &= L \left( 1 - \frac{1}{2} \frac{L}{(\pi k)^2 L_p} \right) \\ \langle x(0)^2 \rangle &= L^2 \left( 1 - \frac{L}{(\pi k)^2 L_p} + \frac{3}{4} \left( \frac{L}{(\pi k)^2 L_p} \right)^2 \right). \end{aligned} \quad (\text{D-5})$$

The onset of buckling occurs for a new critical filament length, denoted  $L_c^F$ , solution of an equation analogous to relation (Eq. D-3) with  $k = 1$

$$\mu(\langle x(L_c^F) \rangle - a) = \frac{L_p \pi^2}{\langle x(L_c^F) \rangle^2}.$$

We can prove that

$$L_c^F = L_c \left( 1 + \left( \frac{1}{2\pi^2} \right) \left( \frac{L_c}{L_p} \right) + \left( \frac{1}{4\pi^4} \right) \left( \frac{L_c}{L_p} \right)^2 + O\left( \left( \frac{L_c}{L_p} \right)^3 \right) \right),$$

where  $L_c$  is solution of Eq. D-3. We find for  $L_c^F$

$$L_c^F \approx L_c \left( 1 + 0.051 \frac{L_c}{L_p} + 0.026 \left( \frac{L_c}{L_p} \right)^2 \right).$$

Thus, for  $L < 2L_p$ , we can use the deterministic Eq. D-3 to predict onset of buckling.

## REFERENCES

- Pollard, T. D., and G. G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453–465.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 297:612–615.
- Sagot, I., S. K. Klee, and D. Pellman. 2002. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4:42–50.
- Chang, F., D. Drubin, and P. Nurse. 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J. Cell Biol.* 137:169–182.
- Tominaga, T., E. Sahai, P. Chardin, F. McCormick, S. A. Courtneidge, and A. S. Alberts. 2000. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol. Cell*. 5:13–25.
- Rivelino, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A. D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* 153:1175–1186.
- Kobielak, A., H. A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* 6:21–30.
- Higashida, C., T. Miyoshi, A. Fujita, F. Ocegüera-Yanez, J. Monypenny, Y. Andou, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2004. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science*. 303:2007–2010.
- Koka, S., C. L. Neudauer, X. Li, R. E. Lewis, J. B. McCarthy, and J. J. Westendorf. 2003. The formin-homology-domain-containing protein FHOD1 enhances cell migration. *J. Cell Sci.* 116:1745–1755.
- Gasman, S., Y. Kalaidzidis, and M. Zerial. 2003. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat. Cell Biol.* 5:195–204.
- Peng, J., B. J. Wallar, A. Flanders, P. J. Swiatek, and A. S. Alberts. 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr. Biol.* 13:534–545.
- Faix, J., and R. Grosse. 2006. Staying in shape with formins. *Dev. Cell*. 10:693–706.
- Kovar, D. R., and T. D. Pollard. 2004. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:14725–14730.
- Romero, S., C. Le Clairche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*. 119:419–429.
- Moseley, J. B., I. Sagot, A. L. Manning, Y. Xu, M. J. Eck, D. Pellman, and B. L. Goode. 2004. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol. Biol. Cell*. 15:896–907.
- Zigmund, S. H., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, A. C. Dar, F. Sicheri, J. Forkey, and M. Pring. 2003. Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr. Biol.* 13:1820–1823.
- Mogilner, A., and G. Oster. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71:3030–3045.
- Mogilner, A., and L. Edelstein-Keshet. 2002. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophys. J.* 83:1237–1258.
- Mogilner, A., and G. Oster. 2003. Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys. J.* 84:1591–1605.
- Alberts, J. B., and G. M. Odell. 2004. In silico reconstitution of Listeria propulsion exhibits nano-saltation. *PLoS Biol.* 2:e412.
- Gerbal, F., P. Chaikin, Y. Rabin, and J. Prost. 2000. An elastic analysis of Listeria monocytogenes propulsion. *Biophys. J.* 79:2259–2275.
- Kuhn, J. R., and T. D. Pollard. 2005. Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 88:1387–1402.
- Amann, K. J., and T. D. Pollard. 2001. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:15009–15013.
- Dill, E. H. 1992. Kirchhoff's theory of rods. *Arch. Hist. Exact Sci.* 44:1–23.
- Pollard, T. D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103:2747–2754.
- Kovar, D. R., E. S. Harris, R. Mahaffy, H. N. Higgs, and T. D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*. 124:423–435.
- Howard, J. 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

28. Gittes, F., B. Mickey, J. Nettleton, and J. Howard. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120:923–934.
29. Isambert, H., P. Venier, A. C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270:11437–11444.
30. Le Goff, L., O. Hallatschek, E. Frey, and F. Amblard. 2002. Tracer studies on f-actin fluctuations. *Phys. Rev. Lett.* 89:258101.
31. Ishijima, A., H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funatsu, and T. Yanagida. 1996. Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces. *Biophys. J.* 70:383–400.
32. Veigel, C., M. L. Bartoo, D. C. White, J. C. Sparrow, and J. E. Molloy. 1998. The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer. *Biophys. J.* 75:1424–1438.
33. Hochmuth, F. M., J. Y. Shao, J. Dai, and M. P. Sheetz. 1996. Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys. J.* 70:358–369.
34. Galkin, V. E., A. Orlova, M. S. VanLoock, A. Shvetsov, E. Reisler, and E. H. Egelman. 2003. ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J. Cell Biol.* 163:1057–1066.
35. Zajac, E. E. 1962. Stability of two planar loop elasticas. *J. Appl. Mech.* 29:136–142.
36. Brennen, C., and H. Winet. 1977. Fluid mechanics of propulsion by cilia and flagella. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 9:339–398.
37. Wilhelm, J., and E. Frey. 1996. Radial distribution function of semiflexible polymers. *Phys. Rev. Lett.* 77:2581–2584.
38. Samuel, J., and S. Sinha. 2002. Elasticity of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E.* 66:050801.



***Article 5 : L'activité de fragmentation de la villine améliore la motilité dépendante de l'actine in vivo.***

**Céline Revenu, Matthieu Courtois, Alphée Michelot, Cécile Sykes, Daniel Louvard, et Sylvie Robine.**

**Résumé :**

La villine est une protéine principalement exprimée dans certains types cellulaires tels que les cellules épithéliales, où elle se localise dans les microvillosités (Bretscher and Weber, 1979), (Matsudaira and Burgess, 1979), (Robine et al., 1985). La villine appartient à la famille des gelsolines. Ces deux types de protéines sont caractérisés par la présence d'un domaine extrêmement conservé d'environ 120 acides aminés, appelé domaine gelsoline ou domaine villine. Ce domaine est répété six fois dans les deux types de protéines. En plus de ces six domaines, la villine possède en C-terminal un domaine appelé tête (Arpin et al., 1988), (Ono, 2007).

La villine possède de multiples activités sur les filaments d'actine, et de nombreuses études suggèrent que les différentes activités soient régulées par le calcium. A de faibles concentrations en calcium (10-100 nM), la villine est capable (contrairement aux gelsolines) de former des câbles de filaments d'actine. Le site responsable de cette activité est situé dans la tête villine. A des concentrations en calcium intermédiaires (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ), la villine est capable d'interagir avec les extrémités barbées des filaments d'actine à la manière des protéines de coiffe. Enfin, aux fortes concentrations en calcium (10-100  $\mu\text{M}$ ), les villines sont capables de fragmenter les filaments d'actine et de coiffer les extrémités barbées à la manière des gelsolines.

Les microvillosités des cellules épithéliales sont des structures très riches en câbles d'actine, où ils jouent un rôle majeur dans la morphogenèse cellulaire (Revenu et al., 2004). Par son activité particulière à créer de telles structures, la villine est donc supposée dans la plupart des études actuelles jouer un rôle majeur pour l'organisation et la maintenance des câbles d'actine. Or, des études récentes ont montré que la délétion du gène codant pour la villine chez la souris n'induisait que des défauts morphologiques mineurs au niveau des cellules épithéliales, mais que la réponse cellulaire de ces cellules était amoindrie. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat est que l'activité de

fragmentation de la villine joue un rôle majeur dans la dynamique de l'actine et permet d'accroître la réponse motile des cellules épithéliales.

Pour confirmer cette hypothèse, ce travail se base sur une comparaison entre les séquences de la protéine de coiffe CapG et la villine, qui a permis de localiser une séquence d'acides aminés responsables de l'activité de fragmentation chez la villine. En introduisant les mutations nécessaires dans cette séquence, il a été possible de créer un mutant de la villine (appelé RRI) possédant toutes les activités caractéristiques de la protéine non mutée, mais avec une activité de fragmentation réduite à 16% de l'activité de la protéine non mutée. La contribution de l'activité de fragmentation de la villine à la dynamique de l'actine a été analysée tout d'abord *in vivo* en se basant sur les propriétés du mouvement de *Shigella flexneri* dans des cellules exprimant soit la villine, soit le mutant RRI. L'activité de fragmentation de la villine permet d'améliorer l'efficacité du mouvement des organismes pathogènes. Ces résultats sont confirmés *in vitro* dans des essais reconstitués de motilité basés sur la propulsion de billes de polystyrène par des comètes de réseaux branchés par le complexe Arp2/3. Les essais *in vitro* ont tout d'abord montré pour la première fois que la villine peut remplacer les protéines de coiffe nécessaires au mouvement. Simultanément, son activité de fragmentation permet comme dans les expériences réalisées *in vivo* d'améliorer l'efficacité du mouvement, et les comètes formées semblent moins denses en actine. Ce travail suggère donc que l'activité de fragmentation de la villine permette indirectement d'accélérer la dépolymérisation des filaments d'actine et d'augmenter la concentration en actine monomérique. L'activité de fragmentation permet d'accélérer la dépolymérisation des filaments d'actine en augmentant le nombre d'extrémités pointues et en coiffant simultanément les extrémités barbées nouvellement formées.

Ma participation à ce travail a permis de confirmer que l'activité de coiffe des filaments d'actine n'est pas affectée dans le mutant RRI. Ceci a pu être réalisé par des cinétiques de polymérisation utilisant l'actine marquée au pyrène, pour mesurer l'inhibition de la vitesse initiale d'élongation de filaments d'actine préformés en présence de concentrations croissantes de villine. Ces expériences ont permis de montrer que l'affinité des deux constructions pour les extrémités barbées des filaments d'actine est proche ( $K_d \approx 0.8nM$  pour la villine non mutée contre  $K_d \approx 1.8nM$  pour le mutant RRI).

# **ARTICLE 5**





# Villin Severing Activity Enhances Actin-based Motility In Vivo

Céline Revenu,\* Matthieu Courtois,<sup>†</sup> Alphée Michelot,<sup>‡</sup> Cécile Sykes,<sup>†</sup> Daniel Louvard,\* and Sylvie Robine\*

\*Laboratoire de Morphogenèse et Signalisation Cellulaires, Unité Mixte de Recherche 144, Centre National de la Recherche Scientifique/Institut Curie, 75248 Paris Cedex 05, France; <sup>†</sup>Laboratoire Physico-Chimie Curie, Unité Mixte de Recherche 168, Institut Curie/Centre National de la Recherche Scientifique/Universités Paris 6 and 7, 75231 Paris Cedex 05, France; and <sup>‡</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Unité Mixte de Recherche 5168, Commissariat à l'Energie Atomique/Centre National de la Recherche Scientifique/Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Submitted May 17, 2006; Revised December 4, 2006; Accepted December 7, 2006  
Monitoring Editor: Yu-li Wang

Villin, an actin-binding protein associated with the actin bundles that support microvilli, bundles, caps, nucleates, and severs actin in a calcium-dependant manner in vitro. We hypothesized that the severing activity of villin is responsible for its reported role in enhancing cell plasticity and motility. To test this hypothesis, we chose a loss of function strategy and introduced mutations in villin based on sequence comparison with CapG. By pyrene-actin assays, we demonstrate that this mutant has a strongly reduced severing activity, whereas nucleation and capping remain unaffected. The bundling activity and the morphogenic effects of villin in cells are also preserved in this mutant. We thus succeeded in dissociating the severing from the three other activities of villin. The contribution of villin severing to actin dynamics is analyzed in vivo through the actin-based movement of the intracellular bacteria *Shigella flexneri* in cells expressing villin and its severing variant. The severing mutations abolish the gain of velocity induced by villin. To further analyze this effect, we reconstituted an in vitro actin-based bead movement in which the usual capping protein is replaced by either the wild type or the severing mutant of villin. Confirming the in vivo results, villin-severing activity enhances the velocity of beads by more than two-fold and reduces the density of actin in the comets. We propose a model in which, by severing actin filaments and capping their barbed ends, villin increases the concentration of actin monomers available for polymerization, a mechanism that might be paralleled in vivo when an enterocyte undergoes an epithelio-mesenchymal transition.

## INTRODUCTION

Villin is an actin-binding protein whose expression pattern is primarily restricted to the epithelial cells of the intestine and kidney proximal tubules where it localizes to microvilli (Bretscher and Weber, 1979; Matsudaira and Burgess, 1979; Robine *et al.*, 1985). Microvilli are thin membrane extensions at the apical pole of epithelial cells, they largely increase the cell surface available for absorption and secretion. Microvilli have been extensively studied and shown to be a good model to understand morphogenesis and differentiation of cells. They are sustained by bundles of parallel actin filaments. Numerous actin-binding proteins among which is villin are responsible for the organization and the maintenance of the actin cytoskeleton in microvilli (Revenu *et al.*, 2004).

Villin belongs to the gelsolin family. All proteins of this family are organized around a conserved module of ~120 amino acids. This module is repeated three times in the

proteins severin and fragmin that belong to lower eukaryotes (*Dictyostelium* and *Physarum*, respectively). Along evolution, a further duplication of the three modules occurred in gelsolin and villin, which contain six modules (Arpin *et al.*, 1988; Bazari *et al.*, 1988). These six modules named V1–V6 constitute the core of the villin protein (see Figure 1). Villin contains an additional C-terminal domain that is absent in gelsolin, called the headpiece (Arpin *et al.*, 1988). The villin effects on actin have been analyzed in vitro and were shown to depend on the calcium concentration (Bretscher and Weber, 1980; Glenney *et al.*, 1980, 1981; Mooseker *et al.*, 1980). At low calcium levels (10–100 nM), villin bundles actin filaments. At micromolar calcium concentrations, villin starts to nucleate and cap the barbed ends of actin filaments. At higher calcium concentrations, villin is able to sever actin filaments, and this activity reaches its maximum efficiency above 100  $\mu$ M calcium. Phosphorylation has also been shown to modulate the properties of villin. The in vitro phosphorylation of different tyrosines in villin enhances its severing and inhibits its bundling activities (Zhai *et al.*, 2001, 2002). The domain responsible for the capping and severing activities of villin is included in the V1 and V2 modules where an F-actin binding site has been localized (Matsudaira *et al.*, 1985; Janmey and Matsudaira, 1988). The second half of the villin core (V4–V6) is essential for its nucleation property (Friederich *et al.*, 1999). The abil-

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E06-05-0423>) on December 20, 2006.

  The online version of this article contains supplemental material at *MBC Online* (<http://www.molbiolcell.org>).

Address correspondence to: Sylvie Robine ([sylvie.robine@curie.fr](mailto:sylvie.robine@curie.fr)).

ity to bundle filaments is due to the presence of an additional F-actin-binding site in the headpiece (Glenney and Weber, 1981).

Because villin is able to bundle actin filaments, it was thought to be involved in the formation of microvilli. Indeed, the overexpression of villin in fibroblastic-like cells CV1 is able to induce the formation of microvilli (Friederich *et al.*, 1989), and the transcriptional silencing of villin in Caco-2 cells affects their distribution and length (Costa de Beauregard *et al.*, 1995). These data obtained in cell cultures supported a role for villin in the formation and maintenance of microvilli. However, the knock out of the villin gene in mice (*vil*<sup>-/-</sup>) did not induce any detectable ultrastructural alteration of the microvilli of intestinal epithelial cells (Ferrary *et al.*, 1999). Nevertheless, the intestinal epithelium of these mice exhibited a decreased cellular response to stresses and to the induction of lesions by dextran sodium sulfate, treatments that result in intracellular calcium rise (Ferrary *et al.*, 1999). After lesions, enterocytes have to undergo an epithelio-mesenchymal transition (EMT) to reconstitute the epithelial barrier. The studies on the *vil*<sup>-/-</sup> mice suggested that the remodeling of the actin cytoskeleton needed in EMT was impaired in the epithelial cells knocked out for villin. In support of this hypothesis, the efficiency of cell motility and morphogenesis (Athman *et al.*, 2003) as well as the infectious process of *Shigella flexneri* (Athman *et al.*, 2005) were reported to be increased in villin expressing cells, confirming a new role for villin in actin cytoskeleton dynamics.

Our hypothesis is that the villin-severing activity is responsible for the enhancement of actin dynamics. By cutting actin filaments, villin would increase the number of free barbed and pointed ends and enhance the cycling of actin needed for actin based motility. To test this hypothesis, we designed a severing mutant of villin. We demonstrate that this mutant of villin has a strongly reduced severing activity while retaining the other known activities. Because only the severing activity of villin is affected, we used this mutant *in vivo* and in an *in vitro* motility assay to analyze the impact of villin severing on actin-based motility.

## MATERIALS AND METHODS

### Mutagenesis, Protein Expression, and Purification

Human villin cloned in the prokaryotic expression vector pGEX-2T (Friederich *et al.*, 1999) was used as template for the mutation of putative sites responsible for villin-severing activity. All the mutations were introduced using the Quick-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Complementary primers containing the desired mutations were designed as described previously (Kumar *et al.*, 2004a) for the mutations D61N, D86L, and A93G. For the RRI variant (<sup>86</sup>DDFLKG/NTLLKE, <sup>125</sup>GMKHV/AMHKTS), the two regions and the insertion were introduced as follows. The primer sense ACC ACA CAG ATG AAT ACC TTG CTG AAG GAG CGG GCT GTG CAG CAC and the antisense GTG CTG CAC AGC CCG CTC CTT CAG CAA GGT ATT CAT CTG TGT GGT were used to mutate the amino acid sequence <sup>86</sup>DDFLKG in NTLLE. The primer sense GGG GGC GTG GCT TCT GCC ATG AAG ACC TCG GAG ACC AAC TCC and its complementary sequence GGA GTT GGT CTC CGA GGT CTT CAT GGC AGA AGC CAC GCC CCC were used to transform the amino acid sequence <sup>125</sup>GMKHV in AMKTS. The primers sense GTG GCT TCT GCC ATG CAC AAG ACC TCG GAG ACC and antisense GGT CTC CGA GGT CTT GTG CAT GGC AGA AGC CAC were used to introduce an histidine in position 127. The whole gene was sequenced to ensure that only the desired mutations were introduced.

Wild-type (WT) villin and its variants were produced using standard procedures (Friederich *et al.*, 1999). Briefly, villin and its variants, tagged with glutathione S-transferase (GST), were purified from the soluble fraction of *Escherichia coli* BL21 bacteria using glutathione-Sepharose beads. The beads bound to GST-villin were digested with thrombin. Thrombin was then removed from the eluates containing villin and variants by an incubation with *p*-amino-benzamidine agarose beads (Sigma, St. Louis, MO). Proteins were dialyzed overnight against phosphate-buffered saline (PBS). They were then aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

### Actin Polymerization and Depolymerization Assays Using Fluorescence Spectroscopy

Villin activities toward actin filaments were tested by the use of N-(1-pyrene)iodoacetamide-labeled actin (pyrene-actin). Monomeric pyrene-actin fluoresces weakly at 388 nm when excited at 365 nm. When polymerized, a strong fluorescence peak appears at this wavelength. Hence, if actin polymerizes, the fluorescence intensity increases and vice versa (Kouyama and Mihashi, 1981).

Actin was purified from rabbit skeletal muscle acetone powder according to the procedure from Spudich and Watt (1971) and kept in G-buffer (2 mM Tris, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 1 mM dithiothreitol [DTT], pH 8.5) at -80°C. The labeling of actin with pyrene-iodoacetamide was obtained and quantified following standard procedures (Kouyama and Mihashi, 1981). Fluorescence measurements were performed at room temperature using a fluorescence spectroscope (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) driven by the Flwinlab software. The excitation wavelength was set at 365 nm and the emission wavelength at 388 nm. All measurements were done on samples of 400  $\mu$ l.

### Severing of Actin Filaments

Actin (2  $\mu$ M, 30% labeled) was polymerized overnight at 4°C in F-buffer (2 mM Tris, pH 7.2, 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT). At *t* = 0, F-actin was diluted to 100 nM by the addition of F-buffer containing CaCl<sub>2</sub>, villin, and its variants at specified concentrations. The fluorescence intensity was recorded over 330 s. The severing activity was estimated as described previously (Gettemans *et al.*, 1995; Friederich *et al.*, 1999). The decrease in fluorescence per minute of the linear range of the curves was considered as corresponding to 100% activity for WT villin and 0% activity for control experiments without severing protein.

### Nucleation of Actin Polymerization

G-actin (2  $\mu$ M, 10% labeled) was preincubated for 10 min on ice with 24 nM of villin or its variants in G-buffer containing 20  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. At *t* = 0, polymerization was induced by the addition of KCl and MgCl<sub>2</sub> to reach the final concentrations of 100 and 2 mM, respectively. The fluorescence intensity was recorded over 30 min.

### Elongation Assay To Determine the Affinity of Villin for the Barbed Ends of Actin Filaments

Actin filaments (1  $\mu$ M final) were incubated for 5 min at room temperature with various concentrations of WT or RRI villin in F buffer containing 2.5  $\mu$ M free Ca<sup>2+</sup>. Elongation was initiated by the addition to the actin filament mixture of 1  $\mu$ M actin monomers (5% pyrene-labeled) bound to 2  $\mu$ M profilin (human profilin 1 purified as described previously; Fedorov *et al.*, 1994). The polymerization was followed by changes in pyrene fluorescence using a Xenius SAFAS (Safas SA, Monaco). The affinity of the proteins for the barbed ends of actin filaments was determined by the variation of the initial rate of elongation as a function of the concentration of villin, using the following equation:

$$V_i = V_{if} + (V_{ib} - V_{if})$$

$$\left( \frac{K_d + [\text{ends}] + [\text{villin}] - \sqrt{(K_d + [\text{ends}] + [\text{villin}])^2 - 4[\text{ends}][\text{villin}]}{2[\text{ends}]} \right)$$

where  $V_i$  is the observed rate of elongation,  $V_{if}$  is the rate of elongation when all the barbed ends are free,  $V_{ib}$  is the rate of elongation when all the barbed ends are capped,  $[\text{ends}]$  is the concentration of barbed ends, and  $[\text{villin}]$  is the concentration of villin. The data were modeled by Kaleidagraph v3.6 software (Synergy Software, Reading, PA).

### Low-Speed Sedimentation Assay

Actin was polymerized in F buffer and then complemented to reach the final composition of the bundle buffer (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>). F-actin (10  $\mu$ M) was incubated for 1 h at room temperature with villin and its variants (2.5  $\mu$ M) to allow bundling to occur. The proteins were centrifuged at 8000  $\times g$  for 15 min in order to pellet aggregates of filaments but not single filaments. The supernatant was separated from the pellet, and both were loaded on acrylamide gels. The gels were stained with Coomassie brilliant blue.

### Electron Microscopy Analysis of Bundling Activity

To analyze bundling activity, F-actin was polymerized in F buffer and subsequently complemented to reach the composition of the bundle buffer. F-actin (3  $\mu$ M) was incubated overnight at 4°C in the presence of 1.5  $\mu$ M villin WT and variants. Actin filaments were incubated on carbon-coated grids in the presence of 2 mM phalloidin to stabilize filaments. They were fixed with 1% glutaraldehyde and negatively stained by incubation with 2% uranyl acetate. The observations were made with a Philips CM120 electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

### Expression of Villin and Variants in Mammalian Cells

Villin WT and mutants cDNA were cloned in the vector pEYFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA) within the restriction sites EcoRI and SalI. CV1 and LLC-PK-1 cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) complemented with 10% fetal calf serum. CV1 cells were transfected by nucleofection (Amaxa, Gaithersburg, MD) according to the optimized procedure (solution V, program A33). LLC-PK-1 cells were electroporated. At day 5 after transfection, cells were fixed in PFA and extracted with 0.5% Triton X-100. Actin filaments were stained using TRITC phalloidin. Cells were examined under an upright motorized microscope (Leica DMRA2, Wetzlar, Germany) equipped with an interlined CCD camera (Roper CoolSnap HQ, Tucson, AZ) and a piezo-electric motor (LVDT, Physik Instrument, Karlsruhe, Germany) mounted underneath the objective lens for rapid optical Z sectioning. The system was controlled by Metamorph software (Molecular Devices, Downingtown, PA). Stacks of images, taken with a 0.2- $\mu$ m plane-to-plane distance, were restored using the Fast Iterative Constrained PSF-based algorithm (Sibarita, 2005).

For infection experiments, the yellow fluorescent protein (YFP) tag was replaced by mCherry (Shaner *et al.*, 2004) using the restriction sites AgeI-BsrGI. Madin-Darby canine kidney (MDCK)-II cells were cultured as described above for LLC-PK-1. The day before infection, MDCK-II cells were transfected with pmCherry-villin by nucleofection (Amaxa, solution L, program A24).

### Infection by *S. flexneri*

The WT invasive strain of *S. flexneri*, M90T, and its variant expressing the green fluorescent protein (GFP; Rathman *et al.*, 2000) were grown overnight in trypticase soy broth (TCS, Bio-Rad, Hercules, CA). On the day of infection, bacteria were subcultured to midexponential phase. MDCK cells transiently expressing mCherry-tagged WT or RRI villin were washed two times with PBS. *S. flexneri* was added at a multiplicity of infection of 200:1 in DMEM without serum and spun onto the cells at  $2000 \times g$  for 5 min at 20°C. The infected cells were then incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. After 40 min, they were washed with DMEM containing 50  $\mu$ g/ml gentamicin.

For immunofluorescence, WT M90T-infected cells were further incubated for 80 min. After an extensive wash with PBS, they were fixed in PFA and extracted with 0.5% Triton X-100. Actin filaments were stained with Alexa Fluor 488-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR), and DNA was labeled with DAPI. The acquisitions were made with an epifluorescence microscope (Leica DM 6000B) coupled to a CCD camera (Roper CoolSnap HQ) and driven by the software Metamorph.

For videomicroscopy, GFP M90T infected cells were further incubated at 37°C for 20 min. 3D plus time sequences were acquired on an inverted microscope (Leica DMIRB2) with a set-up equivalent to the one described previously for rapid optical Z sectioning. The microscope was equipped with a thermoregulation system (Life Imaging Services, Reinach, Switzerland), allowing incubation of the cells at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Illumination at 488 nm and 575 nm for GFP and mCherry, respectively, was performed with a monochromator. For each wavelength, stacks of four images were acquired every 5 s during 5 min, with a plane-to-plane distance of 1.5  $\mu$ m. GFP bacteria-infecting cells expressing WT and RRI villin at equivalent levels or nontransfected cells were tracked with the Metamorph software. To evaluate the rate of disassembly, the average fluorescence intensity of a fixed area of the comet (diameter 5 pixels), located directly behind the bacterium in the initial frame analyzed, was monitored over 90 s.

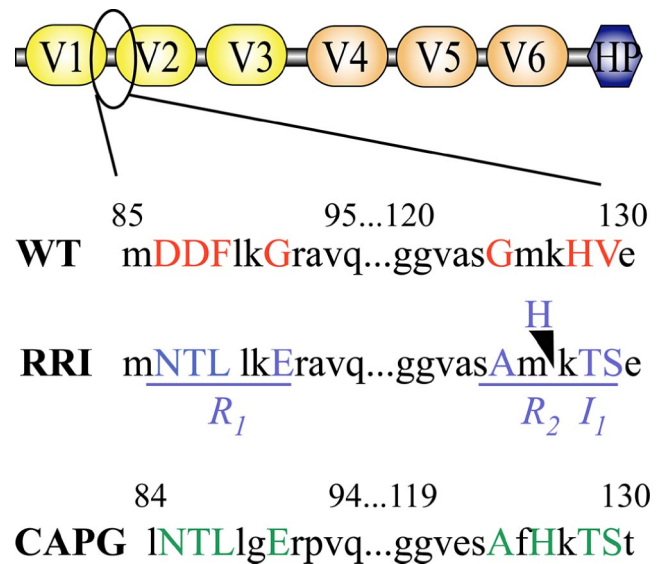
### In Vitro Actin-based Motility Assays

To reconstitute actin-based motility in vitro, polystyrene beads of 1  $\mu$ m in diameter (Polysciences, Warrington, PA) were coated with the VCA domain of WASP as described previously and incubated in a motility medium (Bernheim-Groswasser *et al.*, 2002; van der Gucht *et al.*, 2005) containing 8  $\mu$ M F-actin, 0.1  $\mu$ M Arp2/3, 1  $\mu$ M profilin, 5  $\mu$ M ADF, and 0.1  $\mu$ M villin WT or RRI. All the purified proteins were purchased from Cytoskeleton (Denver, CO) except villin that was produced as described above. Comet growth and bead movements were followed in phase-contrast microscopy. The velocity of the propelled beads was measured with the Metamorph software. To analyze the depolymerization of the actin array present in the comet, 10% Alexa 488-labeled actin (Molecular Probes) was used.

## RESULTS

### Design of a Severing Mutant of Villin

The severing activity of villin that requires high calcium concentration in vitro is endowed by a domain shared between modules V1 and V2. It highly overlaps with the domain responsible for the capping activity and with one of the F-actin-binding sites of villin. Several attempts to dissociate severing from the other activities of villin have failed using truncations (Friederich *et al.*, 1999) or point mutations targeting potential regulatory residues (Zhai *et al.*, 2002;



**Figure 1.** The RRI mutations and their localization in villin domains. The scheme describes the domain structure organization of the villin protein. The mutations introduced in comparison with CapG are located in the circled region. This region is known to endow villin with a severing activity. The wild-type (WT) and the mutated (RRI) amino acid sequences of villin are shown as well as the corresponding sequence of CapG. The mutated amino acids are in capital letters. They are clustered in two regions (underlined, R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>) with a histidine inserted (I<sub>1</sub>) in the second region.

Kumar *et al.*, 2004a). We decided to use a rational biochemical approach to design mutations suppressing the severing activity of villin. We took advantage of the work of F. S. Southwick, where he succeeded to introduce a severing activity to the capping protein CapG (Southwick, 1995). CapG is, as villin, a member of the gelsolin family but fails to sever actin filaments. The comparison of the primary structures of CapG with the severing proteins of the family allowed the identification of two sets of divergent amino acids in the severing domain. These amino acids, once mutated, were able to confer a severing activity to CapG (Southwick, 1995). We took the reverse strategy and changed the same amino acids in villin to the CapG sequence. This led to the introduction of four mutations in two regions (R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>) and to the insertion (I<sub>1</sub>) of one histidine in the second region (Figure 1). To simplify the nomenclature, we will refer to this mutant as RRI.

To evaluate the potential impact of the RRI mutations on the severing activity of villin, we referred to the well-studied structure and severing mechanism of gelsolin (McGough *et al.*, 2003; Burtinck *et al.*, 2004). The corresponding R<sub>1</sub> region in gelsolin is located at the C-terminal end of an  $\alpha$ -helix in G1 (Supplementary Figure 1). On activation, this site appears to be precisely situated at the binding site of a calcium ion that is shared between G1 and actin (Choe *et al.*, 2002; McGough *et al.*, 2003). The binding of this shared calcium ion is thought to directly mediate the binding of gelsolin G1 to actin. This suggests that the R<sub>1</sub> mutations introduced in RRI villin and present in CapG could reduce the efficiency of G1 to bind calcium. The corresponding R<sub>2</sub> region is part of the linker between domains G1 and G2. It makes intimate contact with actin in the G1-G2:actin complex (Burtinck *et al.*, 2004). To undergo the conformational changes from the inactive calcium-free structure of gelsolin G1-G3 to the calcium-activated actin-bound one, the G1-G2 linker has to stretch out along actin. This allows the G1 domain



to move away from G2 and to be properly directed toward the region where it will disrupt an actin-actin interaction. Hence the two mutated regions in RRI villin are part of strategic domains in the last step of the activation process of gelsolin severing. The RRI mutations could thus impair the activation and positioning of the V1 domain whose proper insertion in between two actin protomers leads to actin filament severing.

The RRI mutations are located upstream of the minimal F-actin-binding peptide (amino acids 133-147) mapped in villin V2 (de Arruda *et al.*, 1992) and we can thus expect that the binding of villin to filamentous actin will not be impaired. Moreover, a gelsolin construct consisting of G2-G3 and part of the G3-G4 linker is efficient in capping actin filaments (Sun *et al.*, 1994), and structural analysis support an active role of the G3-G4 linker in obscuring the barbed end of a capped filament (Burtnick *et al.*, 2004). We can thus expect that the RRI mutations will not impair the other activities of villin, specifically capping and bundling.

#### The RRI Mutations Most Strongly Impair Villin-severing Activity

The severing efficiency of the RRI mutant has been analyzed and compared with other mutants that have been previously described to reduce the severing activity of villin (Kumar *et al.*, 2004a), namely D61N, D86L, and A93G and their four possible combinations (D61N, D86L; D61N, A93G; D86L, A93G; D61N, D86L, A93G). We also took into account the mutation E74L, which is described to strongly reduce both the severing activity as well as the capping ability of villin.

Severing activity was measured by analyzing the effect of villin and villin mutants on the depolymerization of actin filaments labeled with pyrene. The filaments were diluted below the critical concentration of the pointed ends (100 nM). This results in their depolymerization, which is analyzed by the decrease in fluorescence intensity. The rate of depolymerization is dependant on the number of pointed ends available. By cutting filaments, villin should increase the number of pointed ends and hence increase the depolymerization rate.

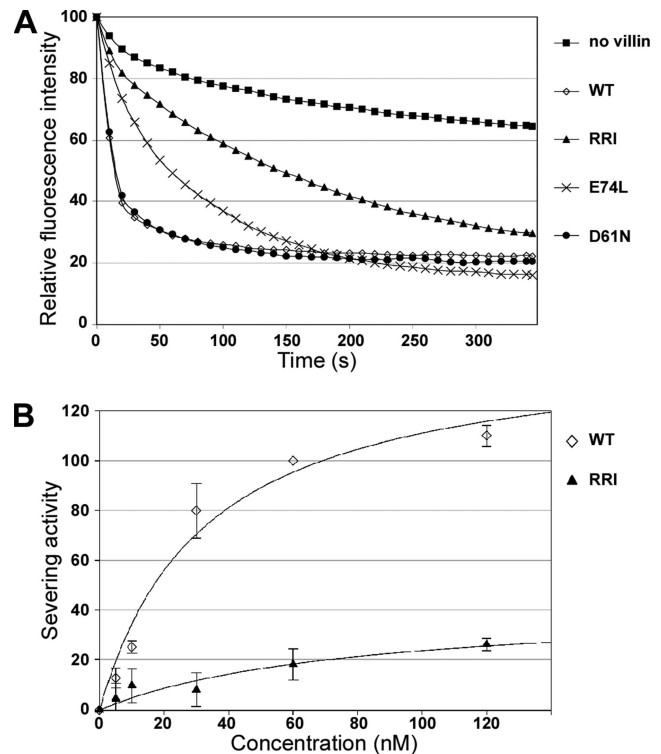
As presented in Figure 2A, a slow depolymerization is observed in the control experiment without villin, whereas the addition of WT villin induces a very fast depolymerization. In these conditions (60 nM villin and variants, 200  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ ) the three point mutations D61N, D86L, and A93G and their four combinations did not allow the detection of a significant difference with the severing activity of WT villin (only D61N is depicted for clarity). However, the mutations E74L and RRI reduced the severing activity of villin to 29 and 16%, respectively. The RRI mutations are thus the most efficiently reducing villin-severing activity. The dose-response analysis of the severing activity of RRI villin compared with WT villin (Figure 2B) confirms this very strong impairment.

To further analyze the severing activity of the RRI variant, we checked the severing activity at lower calcium concentrations (Supplementary Figure 2). As expected, lowering the calcium concentration reduced the severing activity of WT and RRI villin. At 50  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ , the RRI variant had no detectable severing activity. As WT villin, RRI villin is still sensitive to calcium.

#### Capping and Nucleation Activities Are Not Affected

Next, we determined if the RRI mutations were uniquely affecting villin-severing property without affecting the capping and nucleation activities.

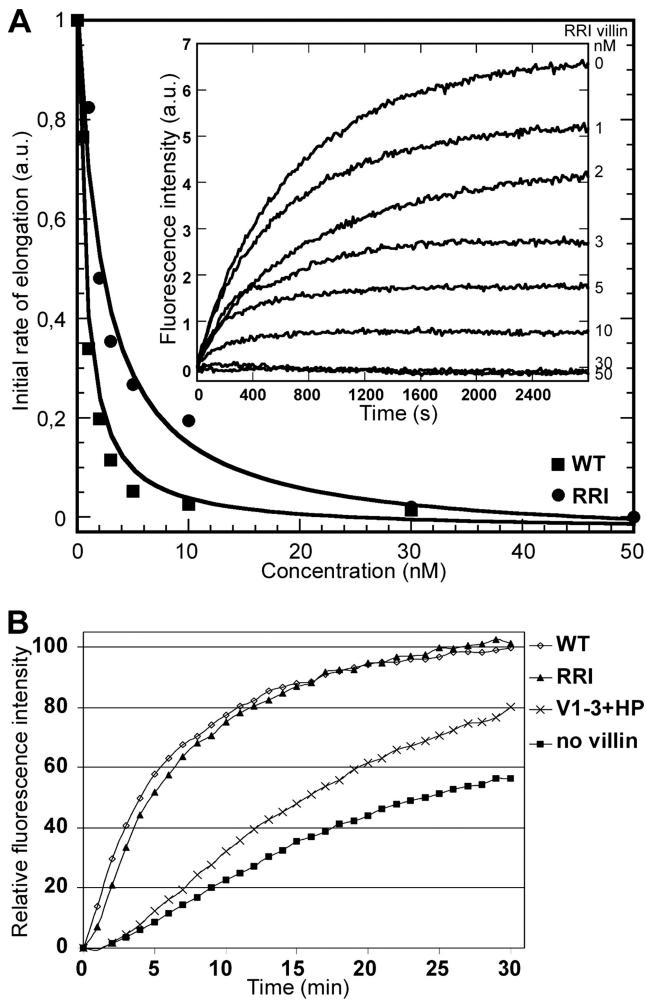
The barbed-end capping activity of villin is saturated at 2.5  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ , whereas severing is not (Northrop *et al.*, 1986).



**Figure 2.** The RRI mutations are the most effective at disrupting the villin-severing activity. Pyrene-labeled actin filaments were diluted below the critical concentration of the pointed end (100 nM) in the presence of villin and its variants or in the absence of any severing protein (no villin). As the rate of depolymerization is proportional to the number of free pointed ends, the severing activity of villin and its variants was measured by following the decrease in fluorescence. (A) Depolymerization of F-actin in the presence of 200  $\mu$ M calcium with 60 nM villin WT, RRI, E74L, and D61N. The graph represents the relative fluorescence intensity plotted as a function of time. The relative fluorescence is calculated to normalize the fluorescence of F-actin to 100 and the one of G-actin to 0. (B) Severing activity of WT ( $\diamond$ ) and RRI ( $\blacktriangle$ ) villin plotted as a function of the concentration.

Actin filament elongation assays were performed in the presence of 2.5  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  in order to determine the affinity of WT and RRI villin for the barbed ends of actin filaments (Figure 3A). Seeds consisting of unlabeled actin filaments were incubated with various concentrations of WT or RRI villin before the addition of pyrene-labeled actin monomers bound to profilin. The increase in fluorescence observed corresponds to the elongation of pyrene-actin-profilin complexes at the barbed ends of the seeds, because profilin-actin does not bind to pointed ends (illustrated for RRI villin in Figure 3A, inset). The decrease in the initial rate of elongation as a function of the concentration of villin reflects the saturation of filament barbed ends by villin (Figure 3A). We determined  $K_d$  values of 0.8 nM for WT villin (Figure 3A, squares) and 1.8 nM for RRI villin (Figure 3A, circles) binding to actin filament barbed ends. This demonstrates that WT and RRI villin have equivalent capping activities in the nanomolar range. Moreover, this affinity is similar to the ones reported for CapG (Southwick, 1995) and gelsolin (Laine *et al.*, 1998).

To evaluate the nucleation activity, we analyzed the initial rate of polymerization of labeled actin monomers (Figure 3B). Incubation with WT or RRI villin induces a strong and immediate polymerization as deduced from the rapid in-

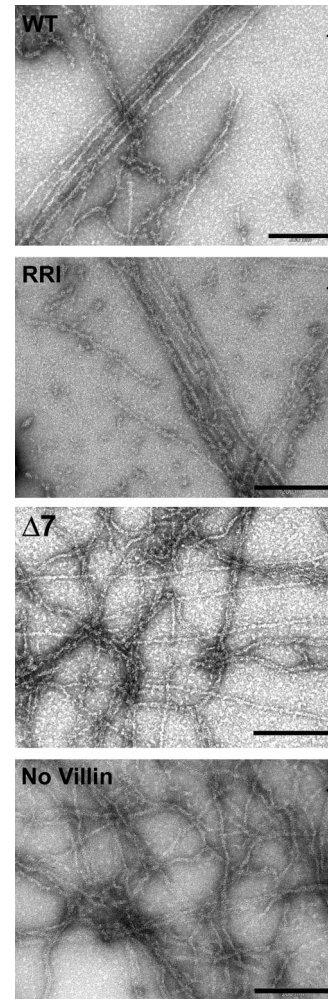


**Figure 3.** The capping and nucleating activities are not affected in RRI villin. (A) To evaluate the capping activity, the elongation of actin filament barbed-ends in the presence of WT and RRI villin was analyzed. Preformed actin filaments (1  $\mu$ M) were incubated with various concentrations of villin before the addition of 1  $\mu$ M pyrene-actin monomers bound to 2  $\mu$ M profilin. The initial rate of elongation was plotted as a function of the concentration of villin WT and RRI. The data were fit with Equation 1 (see *Materials and Methods*) considering 0.11 nM barbed ends, to determine equilibrium dissociation constant values ( $K_d$ ) of around 0.8 nM for WT villin (■) and 1.8 nM for RRI villin (●). Inset, kinetics of actin filament barbed-ends elongation in the presence of various concentrations of RRI villin. (B) The nucleating activity was analyzed by evaluating the initial rate of polymerization of G-actin. Before inducing polymerization, pyrene-actin (2  $\mu$ M) was incubated with villin WT and its variants (24 nM) in the presence of 20  $\mu$ M calcium. No villin, polymerization of G-actin in the absence of nucleating protein; V1-3+HP, polymerization of G-actin in the presence of the nucleation mutant of villin V1-3+HP.

crease of fluorescence observed. The control (without villin) and the nucleation mutant V1-3+HP (Friederich *et al.*, 1999) show a delay of 1–2 min followed by a slow increase of fluorescence. RRI behaves like WT villin, and the RRI mutations thus do not significantly impair villin nucleation activity.

#### RRI Villin Is Still Able To Bundle Filaments

In vitro, at low calcium concentrations (<100 nM), villin is able to cross-link actin filaments in parallel bundles. This



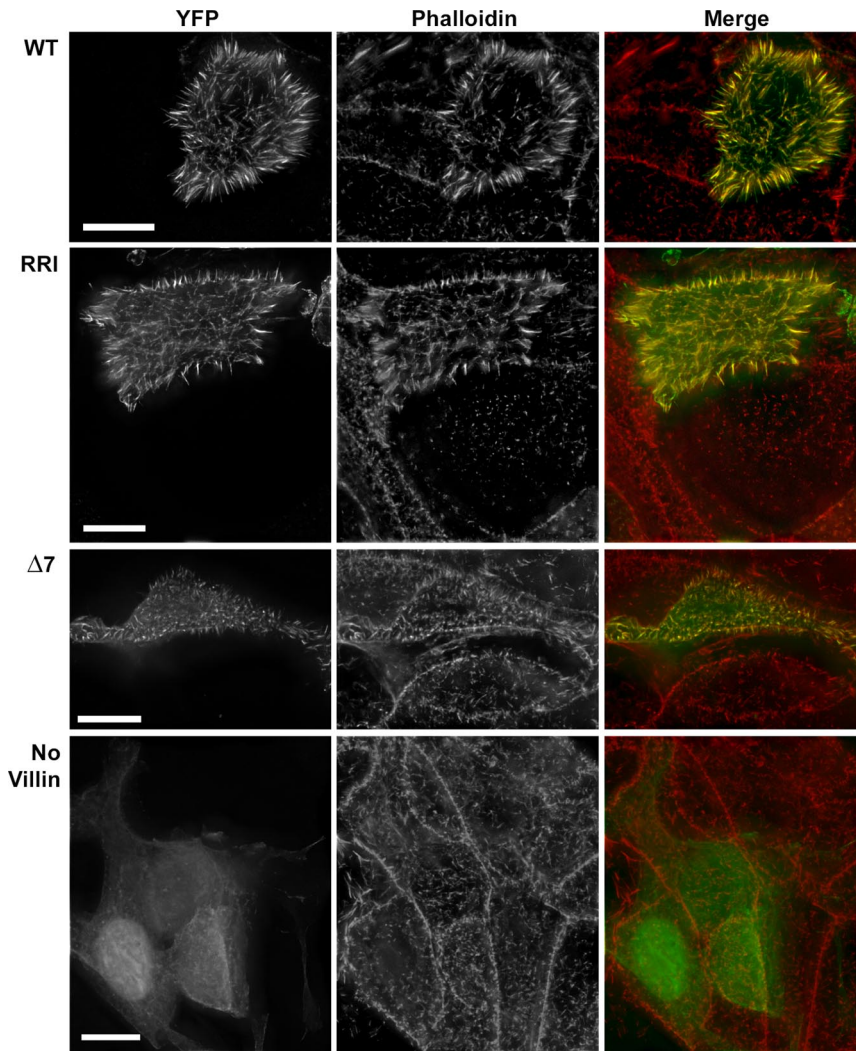
**Figure 4.** The bundling activity is preserved in villin RRI. Electron micrographs of actin filaments (3  $\mu$ M) negatively stained after incubation with villin and its variants (1.5  $\mu$ M) in the presence of EGTA.  $\Delta 7$ , bundling mutant of villin; No villin, control with actin filaments alone. Bars, 200 nm.

bundling ability is abolished by a deletion of the seven last C-terminal amino acids of villin, villin  $\Delta 7$  (Friederich *et al.*, 1992). The formation of elongated bundle-like filaments observed upon incubation of Alexa-labeled F-actin with villin WT or RRI in presence of EGTA was confirmed by a low-speed sedimentation assay of actin filaments incubated with villin and its severing and bundling mutants, RRI and  $\Delta 7$ . Most of the actin was pelleted with villin WT and RRI, whereas it remained in the supernatant in the absence of villin or with villin  $\Delta 7$  (Supplementary Figure 3). To confirm that WT and RRI villin bundled actin filaments, they were processed for electron microscopy (Figure 4). In the presence of WT and RRI villin, straight actin filaments closely aligned in parallel bundles were observed. Actin filaments alone or incubated with the bundling mutant  $\Delta 7$  appeared as single intermingled filaments with few disorganized aggregates but no bundles could be observed.

#### The Morphogenic Effects of Villin Are Preserved Despite the Lack of Severing Activity

The overexpression of villin in CV1 cells is known to induce long microvilli on the dorsal face of the cells (Friederich *et*





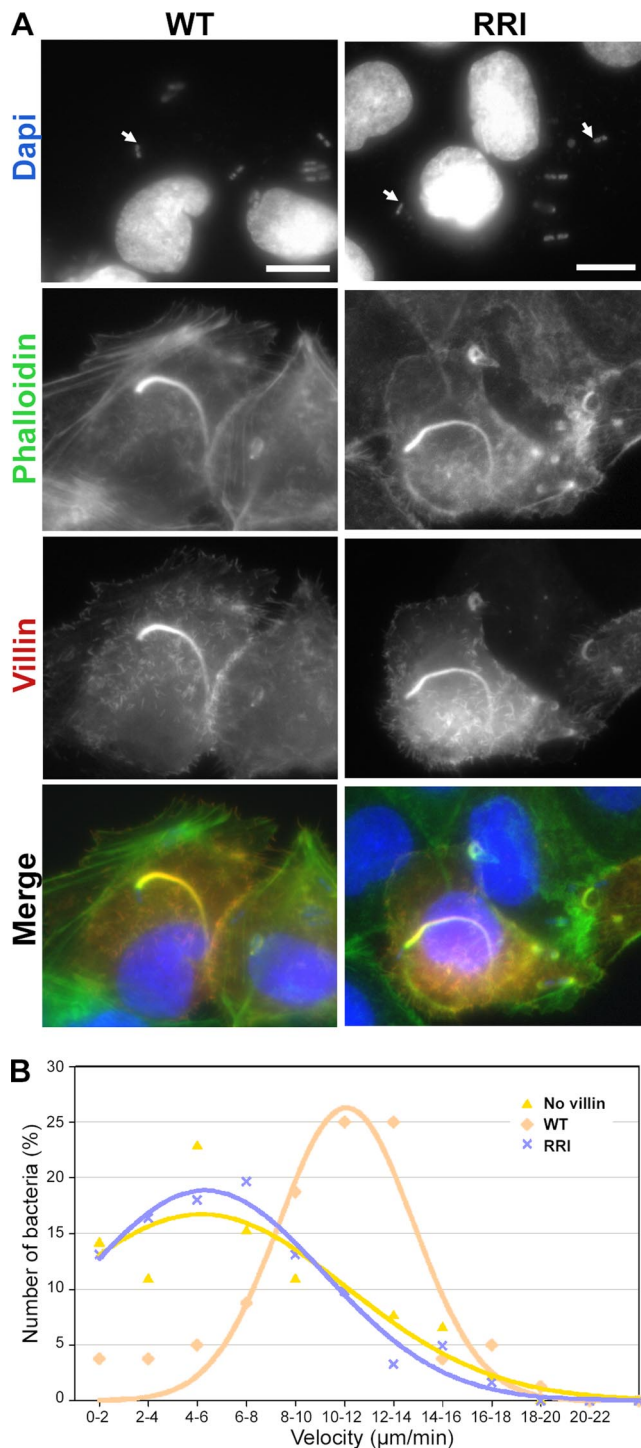
**Figure 5.** WT and RRI villin have the same localization and morphogenic effects in LLC PK-1 cells. LLC PK-1 cells were transiently transfected with cDNAs encoding wild-type villin (WT, upper row), the severing mutant (RRI, second row), and the bundling mutant ( $\Delta 7$ , third row) tagged with the fluorophore YFP or the YFP plasmid alone (No villin, last row). Cells were fixed and stained for actin with TRITC phalloidin. The acquisitions were made using 3D deconvolution microscopy. The pictures shown are the result of the projection of deconvolved Z-stacks in which the bottom of the cells were removed to avoid visualization of stress fibers. Bars, 10  $\mu$ m.

*al.*, 1989). In LLC PK-1 cells, the overexpression of villin lengthens the existing microvilli (Arpin *et al.*, 1994; Loomis *et al.*, 2003). These morphogenic effects are abolished by the disruption of villin bundling activity (Friederich *et al.*, 1992). In Figure 5, we illustrate the consequences of the overexpression in LLC PK-1 cells of YFP-tagged villin WT and its variants. As for WT villin, RRI villin-overexpressing cells have elongated microvilli on their apical surface. Actin filaments colocalize with villin WT and RRI in these structures. On the contrary, although the bundling mutant of villin,  $\Delta 7$ , is properly localized with actin in the microvilli, it does not induce detectable structural modifications. The expression of the YFP tag alone (control) does not change the morphology of the cells. The overexpression of villin and its variants in CV1 cells lead us to the same conclusions: villin WT and RRI but not  $\Delta 7$  induced the appearance of microvilli on the dorsal face of the cells (data not shown). In conclusion, disrupting the severing activity in the RRI villin affects neither its localization in microvilli nor its morphogenic consequences.

#### **WT But Not RRI Villin Enhances the Velocity of *S. flexneri* In Vivo**

To test the impact of the loss of villin-severing activity in cells, we analyzed the movement of the enteroinvasive bac-

terium *S. flexneri* as a potential process where villin-severing activity might be acting. The motility of *S. flexneri* or *Listeria monocytogenes* is indeed widely accepted as a model to study actin dynamics supporting cell movement. Primary cultures of enterocytes cannot be readily transfected at present, but the polarized epithelial cells MDCK were shown, when transfected or not with the villin cDNA, to behave in a comparable way to primary cultures of enterocytes from WT or villin-deficient mice (Athman *et al.*, 2003). MDCK cells were thus transiently transfected with mCherry-tagged WT and RRI villin and infected with *S. flexneri*. As *S. flexneri* enters the cell, it recruits the cell's cytoskeleton machinery to produce an actin tail. This comet allows the bacteria to move inside the cell (Bernardini *et al.*, 1989). As previously described for WT villin (Athman *et al.*, 2005), RRI villin is also incorporated in the comet where it colocalizes with actin (Figure 6A). The movement of GFP *S. flexneri* in these cells was analyzed by videomicroscopy (see Supplementary Video 1 available as supplementary data). All bacteria that show a directional movement in WT and RRI villin-transfected cells are propelled by a comet labeled with mCherry-villin. The velocities (Figure 6B) calculated from the movies give an average rate of  $7.0 \pm 4.3 \mu\text{m}/\text{min}$  in nontransfected cells ( $n_{\text{Control}} = 92$ ),  $6.7 \pm 4.0 \mu\text{m}/\text{min}$  in RRI villin expressing cells ( $n_{\text{RRI}} = 61$ ), and  $10.3 \pm 3.7 \mu\text{m}/\text{min}$  in WT villin



**Figure 6.** The RRI mutations abolish the villin-dependent increase in velocity of *S. flexneri*. (A) As WT villin, RRI villin is localized in *S. flexneri* actin tails. MDCK cells were transiently transfected with mCherry-tagged WT and RRI villin and infected for 2 h with *S. flexneri*. Actin is stained with Alexa 488-phalloidin, and the bacteria and cells DNA were labeled with DAPI. Bars, 10 μm. (B) Distribution of bacteria as a function of their velocity in cells expressing WT villin (pink), RRI villin (blue), or no villin (yellow). The velocities were calculated from the video (see Supplementary Data) of GFP bacteria infecting MDCK cells transiently transfected with mCherry-tagged WT and RRI villin or nontransfected (no villin). The bacteria moved with an average rate of  $7.0 \pm 4.3$  μm/min in nontransfected cells ( $n_{\text{Control}} = 92$ ),  $6.7 \pm 4.0$  μm/min in RRI villin expressing cells

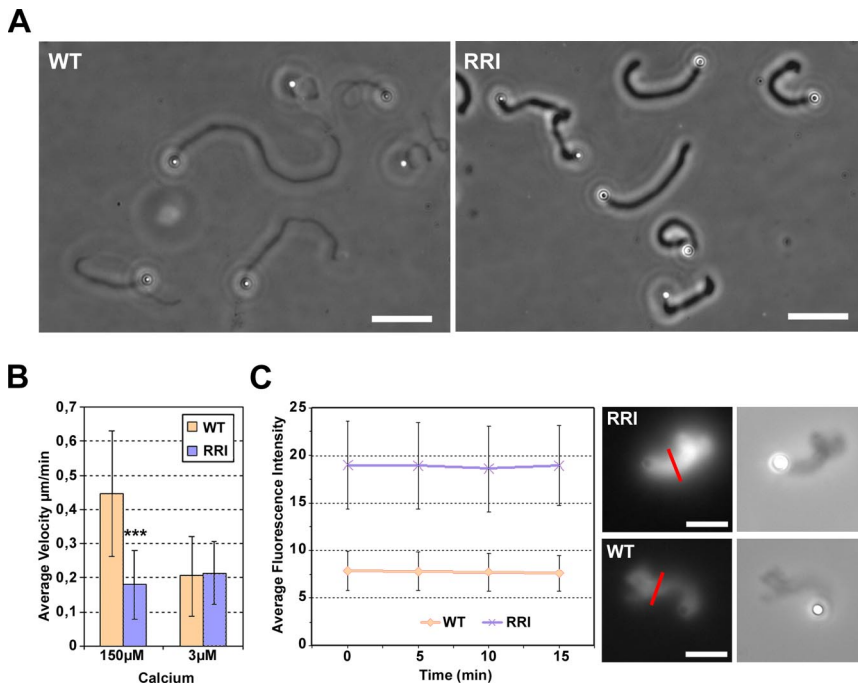
expressing cells ( $n_{\text{WT}} = 80$ ). The increase in velocity reported for the bacteria in the presence of WT villin is highly significant (Wilcoxon test,  $p = 2.213\text{E-}07$ ; Athman *et al.*, 2005) and is lost in the presence of RRI villin (Figure 6B). Indeed, the velocities of bacteria moving in nontransfected cells are not significantly different from those in RRI villin expressing cells (Wilcoxon test,  $p = 0.7813$ ). The fluorescence decay of the comets labeled with villin was not significantly different in the presence of WT or RRI villin, indicating that the rate of disassembly is not modified, whereas the comets were significantly longer in the presence of WT as compared with RRI villin ( $4.0 \pm 1.8$  and  $2.7 \pm 1.7$  μm, respectively,  $n_{\text{WT}} = 39$  and  $n_{\text{RRI}} = 26$ ,  $t$  test,  $p < 0.01$ ). The wide distribution of the velocities as well as the heterogeneity in the length and intensity of the comets analyzed limit the analysis of the actin dynamics in this system. Moreover, the activation status of villin and its mutant activities in cells cannot be controlled. This prompted us to use a simplified biomimetic system.

#### Villin-severing Activity Enhances the Velocity of Beads in an In Vitro Motility Assay

An in vitro assay has been used to reconstitute an actin-based movement of beads. A minimal set of proteins has previously been described as required for the polymerization of actin comets that propel bacteria (Loisel *et al.*, 1999) and beads (van der Gucht *et al.*, 2005) in the motility medium: an actin nucleator (Arp2/3) and its activator grafted around the beads (VCA), a capper (gelsolin or CapZ) and the depolymerizing/severing protein ADF/Cofilin. We replaced the capping protein of this assay by villin WT and RRI in the presence of 150 μM free calcium. In these conditions, WT villin is able to cap and sever actin filaments, whereas RRI villin is mostly able to cap filaments as shown in the pyrene assays. The presence of villin WT and RRI instead of the usual cappers allowed the formation of comets and the movement of the beads in the motility medium (Figure 7A). By phase contrast, the comets formed in the presence of the severing mutant of villin appeared darker and thus are denser than those formed in the presence of WT villin (refer also to Figure 7C). We analyzed the velocities of the beads induced by villin and its severing mutant. We measured the beads velocity by recording the lengthening of a comet over a given time. Indeed, as previously reported with this assay (Bernheim-Groswasser *et al.*, 2002), the actin comets are terminated with a dense cloud at the end opposite to the bead. This dense part corresponds to the symmetry breaking event that precedes comet formation (van der Gucht *et al.*, 2005) and is visible throughout the experiment. We thus took advantage of this effect to measure the velocity of the beads that coincides with the lengthening of the comet over time. In the presence of RRI villin, the velocity of the beads was reduced to <50% of the velocity induced by WT villin (Figure 7B). We decreased the free calcium concentration of the motility medium to 3 μM, conditions known to be saturating for the capping activity of villin whereas its severing activity is no longer detectable (Northrop *et al.*, 1986). At 3 μM calcium, the velocity of the beads was not significantly higher for WT villin compared with RRI villin (Figure

( $n_{\text{RRI}} = 61$ ), and  $10.3 \pm 3.7$  μm/min in WT villin expressing cells ( $n_{\text{WT}} = 80$ ). The increased average velocity observed in the presence of WT villin in comparison with control or RRI expressing cells is highly significant (Wilcoxon test,  $p = 2.213\text{E-}7$  and  $p = 2.042\text{E-}7$ , respectively).





**Figure 7.** The severing activity of villin enhances actin based motility in vitro. Actin-based motility was reconstituted using recombinant proteins. (A) Villin WT and RRI are able to replace the capping protein used in the standard motility medium as we observe the growth of comets. Bars, 20 μm. (B) Average velocity of the beads in the presence of WT (pink) and RRI (blue) villin with 150 μM and 3 μM free calcium. In the presence of 150 μM calcium, the velocity of the beads is significantly enhanced with WT villin compared with RRI villin ( $t$  test,  $n_{WT} = 43$ ,  $n_{RRI} = 70$ ,  $p < 0.0001$ ). The reduction of the calcium concentration to 3 μM abolishes the discrepancy between velocities. (C) Evolution over time of the average fluorescence intensity of comets grown with Alexa 488-labeled actin in the presence of WT (pink) and RRI (blue) villin. The fluorescence intensity is the result of the average intensity per pixel of segments of given length drawn perpendicularly to the comets. An example (red line) of the way the measures were done is illustrated on the left pictures showing Alexa 488-actin comets in the presence of WT (lower picture) and RRI (upper picture) villin. Corresponding phase-contrast pictures are given on the right. Bars, 5 μm.

7B). The average velocity of the beads remained about 0.2 μm/min in the presence of villin RRI but dropped from 0.45 to 0.2 μm/min in the presence of WT villin. The severing activity of villin is thus responsible for an enhancement of actin-based motility in vitro.

#### *Villin Does Not Sever Actin Branches in the Body of the Comets*

We have just shown that the severing activity of villin has a direct impact on the velocity of beads; therefore, we investigated whether this severing activity is occurring in the comets. The villin present in the medium could sever the branches stabilized in the comets and hence liberate numerous short actin filaments with free pointed ends. If this is the case, the amount of actin found in the comet should decrease over time. To analyze this possibility, we monitored the change in the fluorescence intensity of segments drawn perpendicularly to the comets. First, the comets formed with villin RRI showed a significantly higher fluorescence intensity than the ones formed with WT villin (Figure 7C), indicating that they contain more actin. Hence, the increased density observed in phase-contrast microscopy of the comets formed with RRI villin (Figure 7A) is due to a higher content of actin. Second, neither the presence of WT villin nor the one of RRI villin allowed the detection of a decrease of the fluorescence intensity over time. The same results were obtained by evaluating the maximal fluorescence intensity of the segments (data not shown). In conclusion, the difference in actin dynamics reported in presence of WT and RRI villin does not seem to be due to severing of the actin branches in the comet body once formed. The enhancement of actin dynamics reported would then only be due to the severing by WT villin of filaments free in the medium and elongating at the bead surface.

## DISCUSSION

We succeeded in dissociating the severing activity from the three other activities of villin. This result contrasts with a recent report where the same mutations were introduced in a truncated gelsolin protein (aa 1-160), however, without affecting its severing activity (Zhang *et al.*, 2006). There are several explanations for this discrepancy: villin and gelsolin are structurally similar; however, their specific activities are not regulated via identical mechanisms. Therefore the same mutations in the two proteins may have two different effects. In addition the gelsolin mutations were made on a truncated protein that may not mimic the behavior of a full-length protein with the same mutations. This highlights the importance of the various domains in the regulation of the proteins different activities. The severing mutant characterized in our work has nucleation and capping and bundling activities similar to that of WT villin and localizes properly in cells. The use of this mutant in functional assays in vivo and in vitro allows us to demonstrate that villin-severing activity is responsible for an enhancement of actin-based motility.

#### *Villin-severing Activity Enhances Actin-based Motility*

Villin increases the velocity of the bacteria *S. flexneri* in vivo (Athman *et al.*, 2005). We not only confirm this result in MDCK cells by reporting a 45% rise in the average velocity of the bacteria in presence of WT villin but also show that the severing mutant of villin generated in this study abolishes this increase. The fact that the disassembly rate of the comets was not affected, whereas length and velocities were modified, is in favor of a role for villin in an enhancement of the polymerization at the surface of the bacteria. Similar results were obtained for *L. monocytogenes* motility after overexpression of gelsolin in infected cells (Laine *et al.*, 1998). Nevertheless, a decrease, due to gelsolin, of the rate of *Listeria* actin tails disassembly has recently been observed after reduction of the calcium concentration (Larson *et al.*, 2005). This was not accompanied by an impairment of the velocity of the bacteria. Playing on the

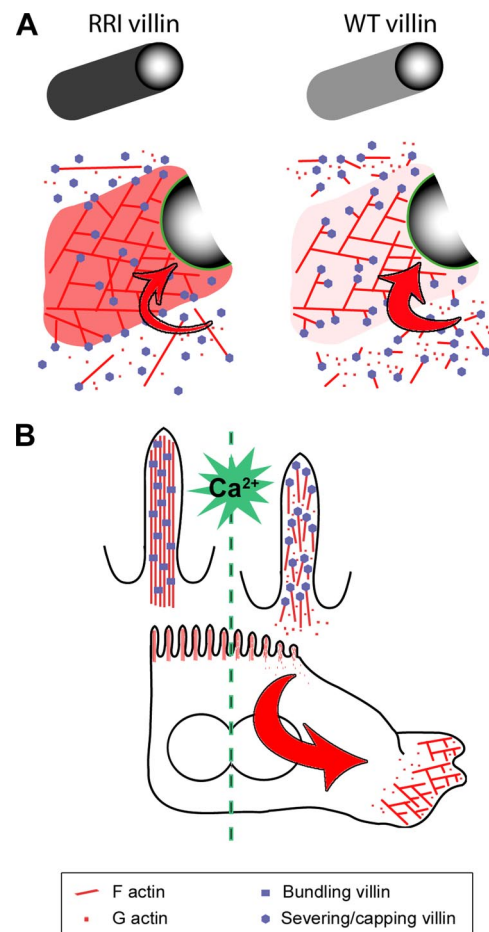
regulation of gelsolin by calcium seems thus to have different effects than the ones observed previously by Laine *et al.* (1998) and in this work for villin.

Numerous parameters that cannot be evaluated are influencing actin polymerization and the movement of the bacteria in the cell. Among them, phosphorylation and phosphoinositides are known to modulate the activity of villin and likely of the RRI mutant. Moreover, the heterogeneity of the cytoplasm and the multiple obstacles that the bacteria have to face are probably responsible for the wide range of velocities reported (Figure 6B and Goldberg and Theriot, 1995) and for the variability observed in the length and intensity of the comet tails. We thus decided to mimic this movement in a simplified model system in order to control these parameters, especially the calcium-dependent biochemical activities of villin, and to validate that the effect reported *in vivo* is directly due to the lack of severing activity in RRI villin. The *in vitro* motility assay that we used generates the actin-based movement of beads. Despite slight differences with the *in vivo* situation (lower velocities, no detectable disassembly of the comets rear), the *in vitro* motility assay strongly strengthens the cell analysis as it results in a twofold increase in the speed of the beads in the presence of WT villin without influencing the disassembly of the comets. This confirms that the severing activity of villin by itself accounts for the enhanced motility of the bacteria. Apart from the fact that we cannot rule out contributions of other, uncharacterized activities of villin that may be affected by the mutations, our results strongly support the relevance of villin-severing activity *in vivo*.

#### What Mechanism Can Be Proposed from the *In Vitro*-reconstituted Motility?

This is the first report where villin is used to reconstitute an actin-based movement *in vitro*. We show that villin is able to replace the capping protein commonly used in this motility assay. The comparison of villin and its severing mutant RRI demonstrates a cooperation between the capping and severing activities in inducing and accelerating the actin-based movement. The comets formed in cell-free assays are most probably made of an Arp2/3 branched actin array (Svitkina and Borisy, 1999; Cameron *et al.*, 2001). The site of polymerization is located at the interface between the bead and the comet where the Arp2/3 complex is activated. A capping protein, villin in our case, is required to limit the elongation process in space and to concentrate the force production toward the bead. Villin has a higher affinity for barbed end than for side binding on actin filaments (Northrop *et al.*, 1986). Hence, as soon as the filaments elongate away from the bead, they are capped by villin, and all filaments that do not face the bead surface are expected to be barbed-end capped.

To account for the increased velocity reported, the severing activity of villin must somehow raise the concentration of actin monomers available for polymerization and hence accelerate the polymerization rate, which is directly proportional to the concentration of actin subunits (for review see Pollard and Borisy, 2003). As gelsolin, villin severs actin filaments and rapidly caps the newly formed barbed ends (Northrop *et al.*, 1986). Severing by villin thus creates a net increase of free pointed ends. Consequently, in our assay, the villin-severing activity induces the appearance in the medium of an increased number of filaments capped at their barbed ends and free at their pointed ends. This increases net depolymerization and leads to a higher concentration of actin monomers. Actin polymerization is enhanced at the only free barbed-ends available, at the interface between the beads and the comets (illustrated in Figure 8A). Both *in vitro* and *in vivo*, there is no



**Figure 8.** Model for the enhancement of actin dynamics by villin-severing activity. (A) Model depicting the consequence of the villin-severing activity on the motility of beads or bacteria. At high calcium concentration, in the presence of RRI villin that lacks severing activity, the branched actin array in the comet as well as filaments in solution are capped at their barbed ends except at the bead/bacterium surface. This maintains a pool of actin monomers free to polymerize at the only barbed ends available: at the bead/bacterium surface (flux of monomers depicted by a red arrow). In the presence of WT villin, the severing activity followed by capping creates a higher number of free pointed ends in solution, which increases the concentration of actin monomers and the polymerization rate at the bead surface (enlarged red arrow). We propose that WT villin cannot only cap but also sever the new branches elongating apart from the bead and hence induce the formation of an actin array with shortened branches. This effect would account for the reduced density of actin in the comets grown with WT versus RRI villin. Moreover, by releasing short actin filaments, severing of the new branches contributes with the severing of filaments in solution to the increased number of free pointed ends. Altogether, villin-severing activity results in an enhancement of the velocity of the beads/bacteria. (B) Proposed role of villin in an enterocyte acquiring a motile phenotype. In a polarized enterocyte, villin is bundling actin filaments in microvilli. As the cell undergoes a calcium-triggered epithelio-mesenchymal transition, villin activity switches to severing. Filaments from the bundles are cut in small-barbed end-capped filaments and depolymerize from their pointed ends. This results in the depolarization of the cell and creates a flux of actin monomers (red arrow) available for polymerization. It enhances the rapid growth of a lamellipodium and augments the movement of the cell as described above for the model of bead/bacterium motility.

difference in the disassembly rate of the comets, whereas the increase in the velocities proves that actin cycling is enhanced by villin severing. Villin severing would thus not occur in the

dense array constituting the comets but in a subset of other actin filaments. The different mechanisms controlling the disassembly of the structurally distinct actin arrays present in cells are indeed not well understood and are starting to be addressed (Briehier *et al.*, 2006).

In the *in vitro* assay, villin could increase the number of filaments available for depolymerization by severing the filaments present in solution and/or in the comet. If a new branch elongating apart from the bead surface is severed by villin, a short actin filament is released in the medium, whereas the branch is directly capped by RRI villin. Thus, the severing of elongating branches by WT villin contributes to the creation of a higher number of filaments with pointed ends free for depolymerization around the beads. Moreover, this could also account for the difference in density of the comets grown in the presence of WT and RRI villin (Figure 8A). The comets produced with WT villin will have shorter branches than the one produced with RRI villin and will thus be less dense in actin as observed (Figure 7, A and C). Because we excluded the possibility of villin introducing cuts in the comet body by measuring over time the fluorescence intensity of labeled actin comets (Figure 7C), villin would thus not have access to the dense actin array in the comet body. If the reported difference in density is indeed due to the creation of shorter branches in the presence of WT villin, we have to postulate that filaments elongating at the bead surface are more accessible to villin than filaments buried in the comet body.

Among the proteins used in this *in vitro* motility assay is the protein ADF/Cofilin. ADF/Cofilin used at high concentrations (5  $\mu$ M) strongly accelerates the symmetry breakage of the actin gel growing around the beads, hence the appearance of a comet, and highly increases the velocity of bacteria or beads (Loisel *et al.*, 1999; van der Gucht *et al.*, 2005). Its property on actin filaments—depolymerizing and/or severing—is still controversial (Carlier *et al.*, 1997; Zebda *et al.*, 2000; Ichetovkin *et al.*, 2002). Even if villin is able to sever filaments, replacing ADF by villin failed in producing motility: a short comet could only very rarely be observed with 100 nM villin in the absence of ADF but never at higher villin concentrations. The concentrations of villin allowing for the formation of comets in the presence of ADF are restricted to a very narrow range, as was already observed for CapZ (Loisel *et al.*, 1999). The velocity of the beads picks at 50–100 nM villin and the movement is already blocked at 300 nM (data not shown). Consequently, at the concentrations used for ADF, the capping activity of villin overcomes the nucleation process by Arp2/3 and blocks the system as it has already been described for CapZ and gelsolin (Loisel *et al.*, 1999; Pantaloni *et al.*, 2000; van der Gucht *et al.*, 2005).

### Villin-severing Activity in Cell Movement

What clues does this work provide to the understanding of villin cellular function? We demonstrated previously that villin enhances the motility and morphogenesis of cells (Athman *et al.*, 2003). The increase in free barbed ends and the reduced F-actin content observed are in favor of a severing mechanism. As for villin, cell motility and dynamics have been positively correlated to cellular gelsolin content. Cells deficient in gelsolin exhibit defects in migration (Witke *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996) and in cytoskeletal remodeling (Hartwig, 1992; Witke *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1997). In accordance with our observations for villin, increased velocity in fibroblasts expressing gelsolin correlates with reduced F-actin fraction and increased actin turnover (McGrath *et al.*, 2000). Finally, villin as well as gelsolin were reported to accelerate the motility of *S. flexneri* (this work and Athman *et*

*al.*, 2005) and *L. monocytogenes* (Laine *et al.*, 1998), respectively.

This set of data suggests a regulation of the actin cycle by the F-actin-severing activity of proteins like villin. However, because these proteins have multiple properties toward actin, at least *in vitro*, it remained to prove that the observed phenotypes are effectively due to the severing activity. This work is to our knowledge the first demonstration of a direct role of the severing activity of villin or a related protein in the enhancement of actin dynamics sustaining motility *in vitro* and *in vivo*.

We believe that this role of the severing activity of villin has a relevance *in vivo* for cell shape changes and movement. By creating pointed ends in an environment where filaments barbed ends are all capped, as in a lamella away from the extreme leading edge, villin could accelerate depolymerization and enhance actin polymerization rate at the leading edge. *In vivo*, on the contrary to our *in vitro* motility assay, villin can be dissociated from the barbed ends by several mechanisms as binding to phosphoinositides (Janmey and Matsudaira, 1988; Kumar *et al.*, 2004b). Villin severing can then also contribute, in cooperation with other severing proteins such as gelsolin and ADF/Cofilin (Chan *et al.*, 2000; Zebda *et al.*, 2000), to the rapid creation of free barbed ends when a burst of polymerization is necessary as for the extension of a lamellipodium.

Finally, the restriction of villin expression to epithelial cells that develop a brush border hints at a particular role of villin in these specialized cells (Figure 8B). Intestinal epithelial cells move in response to signals or stresses in various situations, during embryogenesis, wound healing, or metastatic process. They are not adapted to move in their apico-basal polarized state but need to undergo an EMT to acquire a motile “fibroblastic-like” morphology (Nusrat *et al.*, 1992). This transition requires the remodeling of the actin cytoskeleton. Gelsolin is absent from the microvilli (Yin *et al.*, 1981), where villin is associated with the actin bundles. In response to signaling (calcium, phosphorylation; for review see Revenu *et al.*, 2006), villin could efficiently shift from bundling to severing and rapidly break down this apically concentrated F-actin structure. It would contribute to the depolarization of the cell, increase the concentration of monomers available for polymerization of a new actin structure, and as reported here for bead or bacteria velocity, enhance the efficiency of movement. Our work thus supports a functional role of severing by villin in the EMT of enterocytes.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rania Zaarour and Danijela Vignjevic for careful reading of the manuscript and helpful comments. We thank Graça Raposo and Ahmed El Marjou for their help in the electron microscopy and protein production respectively. We also gratefully thank Laurent Blanchoin and Paul Janmey for their comments and help on the capping assays. We finally acknowledge Jean-Baptiste Sibarita, Vincent Fraissier, and François Waharte for their advices in imaging and for deconvolution. Irit Paz and Philippe Sansonetti kindly gave us *S. flexneri* strains, and Roger Y. Tsien allowed us to use the mCherry fluorescent protein. This work was supported by funds from the French Ministry of Research, Action Concertée Incitative Biologie du Développement et Physiologie Intégrative. C.R. is supported by a Ph.D. fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique.

### REFERENCES

- Arpin, M., Friederich, E., Algrain, M., Vernel, F., and Louvard, D. (1994). Functional differences between L- and T-plastin isoforms. *J. Cell Biol.* 127, 1995–2008.
- Arpin, M., Pringault, E., Finidori, J., Garcia, A., Jeltsch, J. M., Vandekerckhove, J., and Louvard, D. (1988). Sequence of human villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small



- carboxy-terminal domain related to villin specificity. *J. Cell Biol.* 107, 1759–1766.
- Athman, R., Fernandez, M. I., Gounon, P., Sansonetti, P., Louvard, D., Philippot, D., and Robine, S. (2005). *Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 7, 1109–1116.
- Athman, R., Louvard, D., and Robine, S. (2003). Villin enhances hepatocyte growth factor-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4641–4653.
- Bazari, W. L., Matsudaira, P., Wallek, M., Smeal, T., Jakes, R., and Ahmed, Y. (1988). Villin sequence and peptide map identify six homologous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4986–4990.
- Bernardini, M. L., Mounier, J., d'Hauteville, H., Coquis-Rondon, M., and Sansonetti, P. J. (1989). Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3867–3871.
- Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R. M., Carlier, M. F., and Sykes, C. (2002). The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417, 308–311.
- Bretscher, A., and Weber, K. (1979). Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2321–2325.
- Bretscher, A., and Weber, K. (1980). Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. *Cell* 20, 839–847.
- Brieher, W. M., Kueh, H. Y., Ballif, B. A., and Mitchison, T. J. (2006). Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of *Listeria* actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. *J. Cell Biol.* 175, 315–324.
- Burnick, L. D., Koepf, E. K., Grimes, J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., McLaughlin, P. J., and Robinson, R. C. (1997). The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell* 90, 661–670.
- Burnick, L. D., Urosov, D., Irobi, E., Narayan, K., and Robinson, R. C. (2004). Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J.* 23, 2713–2722.
- Cameron, L. A., Svitkina, T. M., Vignjevic, D., Theriot, J. A., and Borisy, G. G. (2001). Dendritic organization of actin comet tails. *Curr. Biol.* 11, 130–135.
- Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136, 1307–1322.
- Chan, A. Y., Bailly, M., Zebda, N., Segall, J. E., and Condeelis, J. S. (2000). Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J. Cell Biol.* 148, 531–542.
- Chen, P., Murphy-Ullrich, J. E., and Wells, A. (1996). A role for gelsolin in actuating epidermal growth factor receptor-mediated cell motility. *J. Cell Biol.* 134, 689–698.
- Choe, H., Burnick, L. D., Mejillano, M., Yin, H. L., Robinson, R. C., and Choe, S. (2002). The calcium activation of gelsolin: insights from the 3A structure of the G4–G6/actin complex. *J. Mol. Biol.* 324, 691–702.
- Costa de Beauregard, M. A., Pringault, E., Robine, S., and Louvard, D. (1995). Suppression of villin expression by antisense RNA impairs brush border assembly in polarized epithelial intestinal cells. *EMBO J.* 14, 409–421.
- de Arruda, M. V., Bazari, H., Wallek, M., and Matsudaira, P. (1992). An actin footprint on villin. Single site substitutions in a cluster of basic residues inhibit the actin severing but not capping activity of villin. *J. Biol. Chem.* 267, 13079–13085.
- Fedorov, A. A., Pollard, T. D., and Almo, S. C. (1994). Purification, characterization and crystallization of human platelet profilin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 241, 480–482.
- Ferrary, E. et al. (1999). In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J. Cell Biol.* 146, 819–830.
- Friederich, E., Huet, C., Arpin, M., and Louvard, D. (1989). Villin induces microvilli growth and actin redistribution in transfected fibroblasts. *Cell* 59, 461–475.
- Friederich, E., Vancompernelle, K., Huet, C., Goethals, M., Finidori, J., Vandekerckhove, J., and Louvard, D. (1992). An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell* 70, 81–92.
- Friederich, E., Vancompernelle, K., Louvard, D., and Vandekerckhove, J. (1999). Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 26751–26760.
- Gettemans, J., De Ville, Y., Waelkens, E., and Vandekerckhove, J. (1995). The actin-binding properties of the *Physarum* actin-fragmin complex. Regulation by calcium, phospholipids, and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 2644–2651.
- Glenney, J. R., Jr., Bretscher, A., and Weber, K. (1980). Calcium control of the intestinal microvillus cytoskeleton: its implications for the regulation of microfilament organizations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6458–6462.
- Glenney, J. R., Jr., Kaulfus, P., and Weber, K. (1981). F actin assembly modulated by villin: Ca++-dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell* 24, 471–480.
- Glenney, J. R., Jr., and Weber, K. (1981). Calcium control of microfilaments: uncoupling of the F-actin-severing and -bundling activity of villin by limited proteolysis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2810–2814.
- Goldberg, M. B., and Theriot, J. A. (1995). *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6572–6576.
- Hartwig, J. H. (1992). Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J. Cell Biol.* 118, 1421–1442.
- Ichetovkin, I., Grant, W., and Condeelis, J. (2002). Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 12, 79–84.
- Janmey, P. A., and Matsudaira, P. T. (1988). Functional comparison of villin and gelsolin. Effects of Ca<sup>2+</sup>, KCl, and polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 263, 16738–16743.
- Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* 114, 33–38.
- Kumar, N., Tomar, A., Parrill, A. L., and Khurana, S. (2004a). Functional dissection and molecular characterization of calcium-sensitive actin-capping and actin-depolymerizing sites in villin. *J. Biol. Chem.* 279, 45036–45046.
- Kumar, N., Zhao, P., Tomar, A., Galea, C. A., and Khurana, S. (2004b). Association of villin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 279, 3096–3110.
- Laine, R. O., Phaneuf, K. L., Cunningham, C. C., Kwiatkowski, D., Azuma, T., and Southwick, F. S. (1998). Gelsolin, a protein that caps the barbed ends and severs actin filaments, enhances the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in host cells. *Infect. Immun.* 66, 3775–3782.
- Larson, L., Arnaudeau, S., Gibson, B., Li, W., Krause, R., Hao, B., Bamburg, J. R., Lew, D. P., Demareux, N., and Southwick, F. (2005). Gelsolin mediates calcium-dependent disassembly of *Listeria* actin tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1921–1926.
- Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613–616.
- Loomis, P. A., Zheng, L., Sekerkova, G., Changyaleket, B., Mugnaini, E., and Bartles, J. R. (2003). Espin cross-links cause the elongation of microvillus-type parallel actin bundles in vivo. *J. Cell Biol.* 163, 1045–1055.
- Lu, M., Witke, W., Kwiatkowski, D. J., and Kosik, K. S. (1997). Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J. Cell Biol.* 138, 1279–1287.
- Matsudaira, P., Jakes, R., and Walker, J. E. (1985). A gelsolin-like Ca<sup>2+</sup>-dependent actin-binding domain in villin. *Nature* 315, 248–250.
- Matsudaira, P. T., and Burgess, D. R. (1979). Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 83, 667–673.
- McGough, A. M., Staiger, C. J., Min, J. K., and Simonetti, K. D. (2003). The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.* 552, 75–81.
- McGrath, J. L., Osborn, E. A., Tardy, Y. S., Dewey, C. F., Jr., and Hartwig, J. H. (2000). Regulation of the actin cycle in vivo by actin filament severing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6532–6537.
- Mooseker, M. S., Graves, T. A., Wharton, K. A., Falco, N., and Howe, C. L. (1980). Regulation of microvillus structure: calcium-dependent solation and cross-linking of actin filaments in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 87, 809–822.
- Northrop, J., Weber, A., Mooseker, M. S., Franzini-Armstrong, C., Bishop, M. F., Dubyak, G. R., Tucker, M., and Walsh, T. P. (1986). Different calcium dependence of the capping and cutting activities of villin. *J. Biol. Chem.* 261, 9274–9281.
- Nusrat, A., Delp, C., and Madara, J. L. (1992). Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. *J. Clin. Invest.* 89, 1501–1511.

- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M. F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* 2, 385–391.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Rathman, M., Jouirhi, N., Allaoui, A., Sansonetti, P., Parsot, C., and Tran Van Nhieu, G. (2000). The development of a FACS-based strategy for the isolation of *Shigella flexneri* mutants that are deficient in intercellular spread. *Mol. Microbiol.* 35, 974–990.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., and Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 635–646.
- Revenu, C., Louvard, D., and Robine, S. (2006). A dual role for the actin binding protein villin, as a key player in the maintenance and plasticity of the intestinal epithelial cell architecture. In: *The Brush Border Membrane from Molecular Cell Biology to Clinical Pathology, Vol. Perspectives in Paediatric Gastroenterology*, Fulda 2005, ed. H. Y. Naim, K.-P. Zimmer, Heilbronn, Germany: SPS Publications, 260–274.
- Robine, S., Huet, C., Moll, R., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Zweibaum, A., and Louvard, D. (1985). Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8488–8492.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572.
- Sibarita, J. B. (2005). Deconvolution microscopy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 95, 201–243.
- Southwick, F. S. (1995). Gain-of-function mutations conferring actin-severing activity to human macrophage cap G. *J. Biol. Chem.* 270, 45–48.
- Spudich, J. A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866–4871.
- Sun, H. Q., Wooten, D. C., Janmey, P. A., and Yin, H. L. (1994). The actin side-binding domain of gelsolin also caps actin filaments. Implications for actin filament severing. *J. Biol. Chem.* 269, 9473–9479.
- Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.
- van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7847–7852.
- Witke, W., Sharpe, A. H., Hartwig, J. H., Azuma, T., Stossel, T. P., and Kwiatkowski, D. J. (1995). Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell* 81, 41–51.
- Yin, H. L., Albrecht, J. H., and Fattoum, A. (1981). Identification of gelsolin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J. Cell Biol.* 91, 901–906.
- Zebda, N., Bernard, O., Bailly, M., Welte, S., Lawrence, D. S., and Condeelis, J. S. (2000). Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.* 151, 1119–1128.
- Zhai, L., Kumar, N., Panebra, A., Zhao, P., Parrill, A. L., and Khurana, S. (2002). Regulation of actin dynamics by tyrosine phosphorylation: identification of tyrosine phosphorylation sites within the actin-severing domain of villin. *Biochemistry* 41, 11750–11760.
- Zhai, L., Zhao, P., Panebra, A., Guerrero, A. L., and Khurana, S. (2001). Tyrosine phosphorylation of villin regulates the organization of the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 276, 36163–36167.
- Zhang, Y., Vorobiev, S. M., Gibson, B. G., Hao, B., Sidhu, G. S., Mishra, V. S., Yarmola, E. G., Bubba, M. R., Almo, S. C., and Southwick, F. S. (2006). A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing. *EMBO J.* 25, 4458–4467.

# CONCLUSION



## Conclusion

Dans un article publié en 2003, Thomas D. Pollard a rappelé l'approche réductionniste adoptée par la biologie cellulaire moderne, et en particulier dans le domaine de la recherche sur le cytosquelette (Pollard, 2003). Cette approche réductionniste inclut pour chaque processus biologique étudié, 1/ un inventaire des molécules impliquées, 2/ la détermination des structures moléculaires, 3/ l'identification des partenaires moléculaires, 4/ la mesure des constantes de vitesse et des constantes d'équilibre pour chaque réaction impliquée, 5/ la localisation cellulaire des molécules, 6/ des tests physiologiques confirmant la participation de la molécule au processus cellulaire, et 7/ des modèles mathématiques permettant de comprendre le comportement du système (Pollard, 2003). Il s'ajoute à mon avis à l'approche réductionniste telle que définie par Pollard un aspect crucial à la compréhension des phénomènes biologiques, et qui se trouve à la portée des moyens techniques actuels. Il s'agit de la reconstitution *in vitro* des phénomènes cellulaires à partir du jeu de molécules impliquées. Seule l'élaboration de systèmes biomimétiques capables de reproduire les phénomènes observés dans la cellule permettent de s'assurer de la bonne compréhension d'un phénomène biologique. Le meilleur exemple justifiant cela est l'essai reconstitué de motilité des billes, établi par Loisel et al. en 1999 (Loisel et al., 1999). Avant cette expérience, de nombreuses molécules jouant un rôle dans les phénomènes motiles avaient été identifiées, et leurs fonctions étaient pour la plupart identifiées. Mais avant que l'essai de motilité ne soit réalisé, aucune autre expérience n'avait permis d'établir avec exactitude le jeu de molécules nécessaire et suffisant pour reproduire les phénomènes motiles. Seul cet essai a pu apporter la confirmation que toutes les protéines impliquées majeures étaient connues, et a permis par la suite pour de nombreuses autres protéines de mesurer leur contribution à l'efficacité des processus motiles.

Cette vision réductionniste combinée à l'utilisation de systèmes biomimétiques est celle dont je me suis inspiré tout au long de ma thèse pour comprendre dans un premier temps la formation des câbles de filaments d'actine et dans un deuxième temps la dynamique des filaments d'actine seuls ou sous forme de structures organisées. La stratégie employée combine une étude précise du mécanisme moléculaire des protéines ayant été préalablement démontrées comme étant impliquées dans ces phénomènes biologiques pour émettre ensuite des hypothèses quant au mécanisme pouvant expliquer le phénomène. Dans un deuxième temps, les hypothèses suggérées sont confirmées ou infirmées simultanément par une modélisation physique ou numérique, et par une reconstitution *in vitro* du phénomène à partir des protéines purifiées. Cette conclusion se propose maintenant de résumer point par point les résultats majeurs que j'ai obtenus au cours de ma thèse.



## ***I Les protéines de la famille des formines présentent des différences mécanistiques majeures.***

Les formines sont une famille de protéines présentant de nombreux isoformes chez la plupart des eucaryotes, et l'étude de leur séquence montre de fortes analogies, en particulier dans le domaine FH2 qui sert à définir cette famille de protéines (Higgs, 2005). Malgré ces similitudes, l'étude du mécanisme moléculaire des formines, qui a été entreprise par de nombreux groupes dès 2002, a révélé des différences majeures entre isoformes que l'étude des séquences respectives ne pouvait laisser prévoir.

Une caractéristique commune à toutes les protéines de cette famille est qu'ils sont des facteurs de nucléation de l'actine. Le domaine FH2 est un domaine d'interaction avec l'actine, et peut seul initier la formation de nombreux filaments, alors que le domaine FH1, présent chez la plupart des formines, est un domaine riche en proline qui permet la nucléation de filaments à partir d'actine monomérique complexée à la profiline. Hormis ces quelques caractéristiques communes à toutes les formines, force est de constater dorénavant qu'aucune autre généralité ne peut être faite quant à leur mécanisme d'action.

Concernant le mécanisme de nucléation des formines, toutes les formines étudiées avant que je ne réalise ma thèse étaient démontrées comme étant des facteurs de nucléation processifs de l'actine, c'est-à-dire que suite à la formation d'un nouveau filament, la protéine reste liée à l'extrémité barbée du filament tout en permettant l'insertion progressive de monomères d'actine. Ce mécanisme processif a deux conséquences majeures. Il permet de protéger l'extrémité barbée des filaments d'actine de l'action des protéines de coiffe et il induit une modulation de la vitesse d'élongation des filaments d'actine. En présence d'une formine à l'extrémité barbée du filament d'actine, la vitesse d'élongation du filament dépend alors 1/ du type de formine, 2/ de la présence ou non du domaine FH1 et 3/ de la concentration en profiline. Suivant ces trois critères, nous avons vu que la vitesse d'élongation du filament peut alors varier de 0 fois à 15 fois la vitesse d'élongation qu'a un filament d'actine non coiffé par formine (Romero et al., 2004). Nous avons pu aussi démontrer pour la première fois qu'une formine, en l'occurrence la FORMIN1 d'*Arabidopsis thaliana*, se comporte de façon non-processive, c'est-à-dire que rapidement après la nucléation d'un nouveau filament d'actine, la formine est capable de libérer l'extrémité barbée du filament pour lui permettre de s'allonger librement. Nous avons montré de plus que cette propriété est liée à la présence du domaine FH1. Alors que le domaine FH2 seul se comporte comme une protéine de coiffe, c'est-à-dire lie fortement l'extrémité barbée des filaments tout en bloquant leur élongation, l'ajout du domaine FH1 au domaine FH2 diminue l'affinité de la protéine pour l'extrémité barbée des filaments, et coiffe alors faiblement les filaments.

## Conclusion

Une conséquence du mécanisme non-processif est que FORMIN1 est en compétition avec les protéines de coiffe pour les extrémités barbées des filaments d'actine. Ajouté à cela, ce travail a permis de montrer pour la première fois qu'une formine pouvait interagir fortement avec le côté des filaments d'actine. Cette propriété est aussi liée à la présence du domaine FH1. Mais contrairement à l'interaction avec l'extrémité barbée, la présence du domaine FH1 permet d'augmenter fortement l'affinité de la protéine pour le côté du filament d'actine. La capacité de lier le côté des filaments d'actine a depuis été montré pour quelques autres isoformes de formines. A l'heure actuelle, l'affinité des formines pour le côté du filament semble dépendre à la fois du type de formine étudié et de la présence ou non du domaine FH1.

Tous ces résultats tendent à associer à chaque formine un comportement relativement particulier, et spécialement pour FORMIN1. L'affinité de la construction FH1FH2 de FORMIN1 pour les extrémités barbées (environ 40 nM) est du même ordre de grandeur que l'affinité de FORMIN1 pour le côté du filament (environ 130 nM), mais le nombre de sites accessibles sur le côté des filaments d'actine est très largement supérieur au nombre d'extrémités barbées. Cela nous conduit à suggérer que l'interaction de FORMIN1 avec les filaments d'actine se fasse par le biais d'une compétition directe entre les extrémités barbées des filaments et les sites de fixation latéraux. Cette compétition est favorable à une fixation de FORMIN1 sur le côté du filament, et par conséquent tend à déplacer la protéine sur le côté du filament suite à sa nucléation.

## ***II Les formines sont capables d'organiser les filaments d'actine en câbles épais sans l'aide d'aucun autre partenaire.***

Non seulement certaines formines peuvent interagir avec le côté de filaments d'actine, mais elles peuvent aussi organiser sans l'aide d'aucune autre protéine les filaments en structures complexes de filaments parallèles appelées câbles. Une question essentielle était donc de pouvoir comprendre par quel mécanisme dynamique de telles structures pouvaient s'auto-organiser sans l'aide d'aucune autre protéine. La première question à laquelle nous avons voulu répondre était l'importance pour la protéine formine de pouvoir combiner deux activités de nucléateur de l'actine et d'interaction avec le côté des filaments. Cette particularité nous a permis progressivement d'envisager un mécanisme de formation des câbles, puis de le vérifier expérimentalement par la technique de microscopie à onde évanescence. La compréhension de ce mécanisme et de la polarité des câbles formés s'appuie sur trois éléments essentiels :

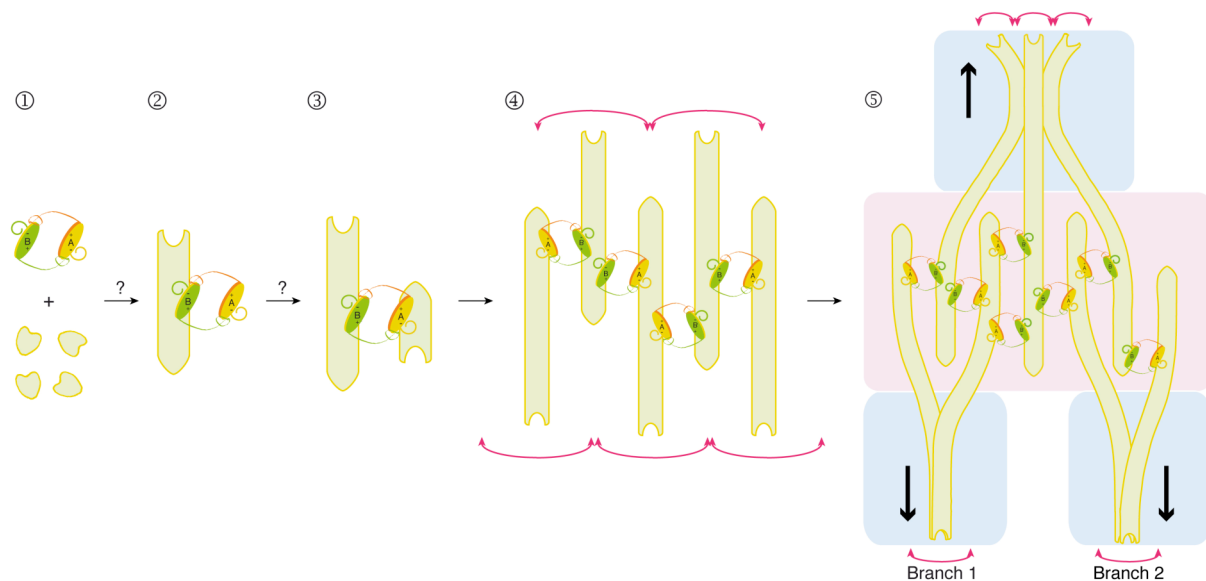
1/ J'ai pu démontrer pendant mon travail de thèse que les deux activités de nucléation et d'interaction avec le côté des filaments d'actine peuvent s'effectuer

simultanément pour certaines formines, comme c'est le cas pour FORMIN1 et mDia2 (voir Figure 38, étapes 2 et 3). Cette capacité pour une formine de nucléer un filament sur le côté d'un filament préexistant est essentielle. En effet, pour former un câble, il faut à la cellule soit amener au contact des filaments distants, soit créer de nombreuses extrémités barbées de filaments à proximité les uns des autres et les allonger en maintenant les filaments groupés, ce qui semble être plus raisonnable dans un environnement cellulaire encombré.

2/ A des concentrations physiologiques en polycations ou polypeptides basiques, l'interaction latérale entre filaments d'actine est énergétiquement favorable (Tang and Janmey, 1996), (Yu and Carlsson, 2003), et les filaments d'actine formés au contact les uns des autres sont donc capables de s'allonger en restant groupés entre eux, par un mécanisme de type fermeture-éclair (voir figure 38, étapes 4 et 5). Ce mécanisme de fermeture-éclair peut se faire entre filaments organisés parallèlement aussi bien qu'entre filaments organisés antiparallèlement (voir Figure 38, étape 5). Il dépend fortement du mouvement brownien des filaments (voir Figure 38, flèches rouges). Toute inhibition des fluctuations thermiques inhibe la fermeture progressive du câble.

3/ Dans un système simple comprenant uniquement de l'actine et des formines, la polarité des câbles formés dépend uniquement de l'organisation initiale des formines et de leur mécanisme processif ou non-processif. Lorsque les formines sont localisées en une zone restreinte de l'espace, les câbles de filaments qui s'allongent à partir de cette zone sont organisés de façon parallèle (voir Figure 38, étape 5, zone bleue). En revanche, lorsque les formines sont organisées tout le long d'un filament préexistant, le câble qui est initié le long de ce filament a une polarité aléatoire (voir Figure 38, étape 5, zone rose).

## Conclusion



**Figure 38 : Mécanisme de formation des câbles de filaments d'actine par FORMIN1.**

Parallèlement à cela, ces expériences ont permis de mettre en valeur pour la première fois la puissance de la microscopie à onde évanescente pour observer en temps réel la dynamique de formation de structures complexes de filaments d'actine. Cette technique, qui avait déjà été employée avec succès pour visualiser la polymérisation de filaments d'actine et pour comprendre le mécanisme moléculaire d'une protéine, a pu être étendue lors de cette étude à l'observation dynamique à l'échelle moléculaire de structures plus complexes. Ce travail représente donc la première étape pour observer à l'échelle moléculaire les comportements collectifs plus complexes entre protéines. Ces observations visuelles permettent pour la première fois d'intégrer sur filaments d'actine, à l'échelle moléculaire, une interdépendance bien souvent négligée entre les effets biochimiques et mécaniques.

### ***III Dynamique stochastique des filaments d'actine modulée par la fragmentation induite par ADF/cofiline.***

Parce que la microscopie à onde évanescente représente une avancée technologique majeure pour l'étude de la dynamique de l'actine à l'échelle moléculaire, nous avons voulu nous en servir pour étudier les mécanismes de désassemblage des filaments d'actine en temps réel qui restent très mal compris et font l'objet de plusieurs modèles contradictoires. Deux idées s'affrontent plus particulièrement : alors que le modèle de Carlier et al. soutient que le désassemblage par l'ADF/cofiline se fait par une dépolymérisation progressive accélérée 25 fois des extrémités pointues (Carlier et al., 1997), le modèle d'Andrianantoandro et al. soutient que le désassemblage se fait

majoritairement par une fragmentation des filaments d'actine ADP (Andrianantoandro and Pollard, 2006).

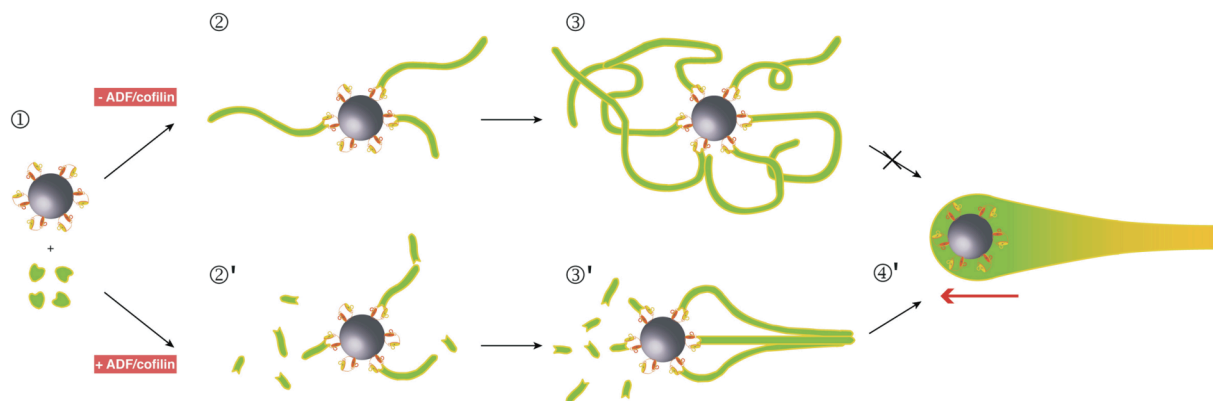
La question sous-jacente à ce problème est de savoir pourquoi l'ADF/cofiline est capable de désassembler les filaments d'actine de manière contrôlée. En effet, pour un filament d'actine s'allongeant à son extrémité barbée à une vitesse donnée, le désassemblage à proximité de l'extrémité pointue doit se faire en moyenne à la même vitesse si la cellule ne veut pas que le filament croisse indéfiniment ou au contraire disparaisse. Pour comprendre ce phénomène, nous avons utilisé le facteur de nucléation processif de l'actine mDia1 greffé sur des billes de polystyrène (voir Figure 39, étape 1). L'ajout d'actine monomérique en présence ou en absence de profiline permet la formation de nuages d'actine autour des billes (voir Figure 39, étape 2), qui grossissent jusqu'à ce que le réservoir d'actine soit épuisé (voir Figure 39, étape 3). Un avantage de ce système est qu'il est possible de distinguer en permanence les extrémités barbées (au contact de la bille) des extrémités pointues (à la périphérie du nuage d'actine), et de moduler la vitesse d'élongation des filaments d'actine en faisant varier la concentration d'actine. Nous avons montré alors que la présence d'ADF/cofiline modifie dramatiquement le comportement des filaments d'actine autour des billes. Après une phase rapide d'élongation, l'ADF/cofiline commence à fragmenter de façon stochastique les filaments d'actine autour de leur extrémité pointue (voir Figure 39, étape 2'), aboutissant à la formation de filaments de longueur moyenne constante. Ce mécanisme de fragmentation permet donc une corrélation parfaitement contrôlée entre l'assemblage des filaments à une extrémité et désassemblage à la même vitesse à l'autre extrémité. Toute variation de la vitesse d'élongation ou de la concentration en ADF/cofiline aboutit à un changement de la longueur moyenne des filaments, mais la corrélation entre les vitesses d'assemblage et de désassemblage subsiste. Nous avons montré ensuite par une modélisation *in silico* de cette expérience incluant toutes les constantes cinétiques de toutes les réactions du système, que la réaction chimique qui régule ce processus et limite la fragmentation des filaments est l'hydrolyse du nucléotide des sous-unités d'actine du filament. Cette expérience permet donc de reconstituer et visualiser pour la première fois une dynamique stochastique des filaments d'actine, et démontre que l'hydrolyse du nucléotide joue le rôle «d'horloge» du filament, permettant à l'ADF/cofiline de sélectionner les portions des filaments d'actine polymérisées depuis plus longtemps (dont le nucléotide est ADP) pour les désassembler, tout en préservant les portions des filaments les plus jeunes (dont le nucléotide est ATP ou ADP-Pi).

### ***IV L'ADF/cofiline favorise la formation de structures rigides de filaments d'actine.***

La microscopie à onde évanescente nous a donc permis 1/ de visualiser la formation de structures complexes de filaments d'actine tels que les câbles, et 2/ de comprendre les phénomènes dynamiques de l'actine à l'échelle du filament individuel. Une suite logique à ce travail consistait donc à s'intéresser à la dynamique des câbles de filaments d'actine en présence d'ADF/cofiline.

Nous avons montré par ces expériences qu'une fois de plus la combinaison des connaissances en biochimie et des connaissances en mécanique permettait d'établir à l'échelle microscopique des comportements collectifs particuliers. La formation de structures épaisses et rigides stabilise les filaments d'actine qui les composent d'un désassemblage par l'ADF/cofiline. Ce phénomène est très important pour expliquer la brisure de symétrie dans les essais de motilité effectués en présence d'actine et d'ADF/cofiline autour de billes de polystyrène fonctionnalisées par la formine mDia1. Nous avons pu observer directement en microscopie à onde évanescente à l'échelle du filament individuel toutes les étapes conduisant de la formation des premiers filaments autour des billes jusqu'à la formation de câbles épais pouvant exercer des forces sur les billes. Dans un premier temps, l'actine polymérise sous forme de filaments individuels de façon isotrope autour des billes. Cela conduit à la formation rapide d'un nuage de filaments qui se désassemble de façon stochastique autour de leurs extrémités pointues par l'ADF/cofiline (voir Figure 39, étape 2'). Au bout d'une dizaine de minutes, la densité de filaments autour des billes devient suffisamment importante pour que les filaments d'actine commencent par endroits à former quelques câbles de filaments (voir Figure 39, étape 3'). Aussitôt, ces structures deviennent plus résistantes à l'action de l'ADF/cofiline. Il existe alors un processus de sélection qui favorise la formation de câbles de plus en plus épais au détriment des filaments seuls et des structures plus petites et moins rigides (voir Figure 39, étape 4'). Quelques câbles très épais subsistent au final et se renforcent progressivement, alors que le reste de l'actine filamenteuse est dépolymérisée pour retourner polymériser dans les câbles épais et les renforcer. Ainsi, la symétrie est brisée en quelques dizaines de minutes, et les câbles deviennent suffisamment épais pour exercer une force non négligeable sur les billes. Les billes étant maintenues dans ces expériences au contact de la lame par des interactions non spécifiques (afin que le système reste dans le champ de l'onde évanescente), les forces exercées par la polymérisation ne peuvent pas mettre la bille en mouvement. Au lieu de cela nous montrons pour la première fois que les forces exercées par la polymérisation sont largement suffisantes pour déformer aussi des structures épaisses de câbles de filaments

d'actine et les faire flamber, comme cela avait été montré auparavant sur des filaments individuels (Kovar et al., 2004).



**Figure 39 : Modèle montrant l'influence de l'ADF/cofiline pour l'accélération du turnover des filaments d'actine, la stabilisation des câbles et la brisure de symétrie.**

### ***V Le flambage des filaments d'actine est un moyen performant de mesurer la force exercée par la polymérisation de l'actine.***

Cela fait maintenant plus de 25 ans qu'il est admis que l'énergie chimique libérée par la polymérisation des filaments d'actine peut être transduite en énergie mécanique (Hill, 1981), et que la polymérisation de l'actine permet d'exercer des forces contre une cible pour la pousser. De nombreux modèles se sont succédés pour expliquer le mécanisme physique sous-jacent, pour trouver l'ordre de grandeur des forces associées, et pour déterminer une relation liant la vitesse de polymérisation du filament en fonction de la force exercée par la cible (Peskin et al., 1993), (Mogilner and Oster, 1996), (Mogilner and Oster, 2003). Mais pour des raisons principalement techniques, aucune donnée expérimentale n'a pu être obtenue avant 2004 à l'échelle du filament individuel pour vérifier la validité de ces modèles. Nous venons de voir que la polymérisation de l'actine permet non seulement d'exercer des forces contre une cible pour la pousser, mais aussi de déformer les filaments d'actine lorsque cette cible est trop rigide. La connaissance des propriétés élastiques des filaments d'actine a alors permis d'évaluer pour la première fois l'ordre de grandeur des forces produites par la polymérisation (Kovar and Pollard, 2004). Pour cela, les auteurs se sont attachés à observer dans quelles conditions un filament d'actine contraint à ces deux extrémités par une formine processive et une myosine pouvait flamber. Au cours de ma thèse, nous avons pu déterminer quantitativement pour la première fois l'intensité précise des forces produites en fonctions des différentes configurations adoptées par le filament. Nous avons montré tout d'abord que la force exercée par le filament sur la cible dépend fortement des

## Conclusion

conditions d'attachement du filament. Ensuite, en extrapolant le modèle jusqu'à des paramètres comparables à ceux de la cellule, nous avons montré que les forces exercées pouvaient atteindre des valeurs aussi élevées que 10 pN par filament.





# **PERSPECTIVES**



## Perspectives

Tous ces résultats soulèvent maintenant de nombreuses nouvelles questions.

1/ Cette thèse s'est attachée à montrer que *Arabidopsis thaliana* FORMIN1 possède un mécanisme particulier qui la différencie des autres formines. Nos expériences en microscopie à onde évanescente suggèrent que cette formine se déplace sur le côté du filament d'actine après l'avoir nucléé, autorisant les extrémités barbées à s'allonger librement. Un des inconvénients de l'utilisation de la fluorescence en microscopie est qu'elle limite la résolution des observations à quelques centaines de nanomètres environ. Il est donc impossible par cette technique de caractériser le mécanisme de nucléation de FORMIN1 en dessous de cette échelle. Plusieurs questions restent en suspens, auxquelles seules des techniques allant en dessous de la résolution de la fluorescence (cristallographie, microscopie électronique) pourraient répondre. Par quel mécanisme FORMIN1 forme-t-elle un noyau d'actine stable capable de s'allonger ? Cette formine est-elle capable d'être processive pendant les premiers événements suivant la nucléation, avant de passer sur le côté des filaments d'actine ?

2/ Il y a 21 isoformes de formines chez la plante *Arabidopsis thaliana* et il semble y avoir de multiples isoformes de formines chez tous les organismes eucaryotes. Parmi ces nombreux isoformes, combien se comportent de façon non-processive comme FORMIN1 ? Existe-t-il même des formines processives chez la plante ? Existe-t-il des formines se comportant de façon non-processive comme FORMIN1 chez d'autres organismes eucaryotes, ou ce type de formines est-il spécifique aux plantes ? Pouvons-nous relier la non-processivité avec la forte affinité pour le côté des filaments d'actine ?

3/ Concernant les forces exercées par la polymérisation d'un filament d'actine, nous avons montré que leur intensité dépend fortement des conditions d'attachement du filament. L'organisation des filaments d'actine dans la cellule et leur attachement est-il alors déterminé de façon à ce que les forces soient exercées de manière optimale ? Notre modèle prédit que les forces exercées par la polymérisation de l'actine peuvent atteindre des valeurs aussi élevées que 10 pN par filament. Alternativement, lorsque la cible est trop rigide, la force exercée par la polymérisation peut faire flamber le filament d'actine jusqu'à lui faire former des boucles. Qu'en est-il *in vivo* ? Les filaments individuels d'actine exercent-ils effectivement des forces aussi importantes dans le contexte cellulaire ? Comment la cellule peut-elle contrôler finement la force exercée par chaque filament ? De tels événements de flambage peuvent-ils se produire dans le cytoplasme ? Sinon, quel mécanisme utilise la cellule pour contrôler que la force est bien exercée pour pousser la cible et non pour déformer le cytosquelette ?

4/ Ce travail s'attache à détailler le mécanisme d'élaboration des câbles de filaments d'actine. Nous avons montré que les fluctuations thermiques des filaments d'actine leur permettent de se regrouper et de former progressivement les câbles par un mécanisme de fermeture-éclair. Toute inhibition des fluctuations thermiques, par exemple par des interactions non-spécifiques avec la lame, empêche les câbles de se former. En revanche, beaucoup de travail reste à accomplir pour comprendre le mécanisme physique sous-jacent. Il paraît particulièrement important de mesurer l'impact des différents paramètres physiques et chimiques, en particulier la viscosité du milieu et le potentiel d'interaction entre les filaments, pour trouver les conditions les plus favorables à la formation des câbles, en présence ou en absence de protéines de pontages.

De plus, très peu de données rendent compte des propriétés mécaniques des câbles d'actine. Comment évoluent ces propriétés en fonctions du nombre de filaments composant la structure ? Quelle pourrait être l'influence des protéines de réticulation vis-à-vis de la rigidité de la structure ? Footer et al. ont montré en 2007 que lors de la polymérisation de plusieurs filaments d'actine contre une cible, seul le filament le plus long à un instant donné exerce une force contre la cible (Footer et al., 2007), posant la question de l'intérêt *in vivo* de former des structures de câbles d'actine pour exercer des forces. Dans l'essai de motilité réalisé à partir des billes de polystyrène sur lesquelles est greffé le facteur de nucléation mDia1, il paraît clair qu'à un instant donné toutes les extrémités barbées des filaments d'actine se trouvent simultanément en contact avec la cible par l'intermédiaire de la formine. Une question qui se pose alors est de savoir si les filaments d'actine dans ces conditions parviennent à coopérer entre eux pour exercer sur la cible une force supérieure à celle qu'exerce un filament unique. Il est en tout cas fort probable que cela soit le cas dans nos expériences lorsque flambent des structures aussi rigides que les câbles de filaments d'actine. Dans ce cas-là, comment évolue alors le module de la force exercée en fonction du nombre de filaments qui se trouvent en contact avec la bille ? Quelle force doit exercer la polymérisation de l'actine pour déformer des structures de câbles de filaments d'actine ? Quelle pourrait être dans ce système l'influence des protéines de réticulation ?

5/ Un résultat majeur de mon travail de thèse a permis de mettre en évidence que l'ADF/cofiline induit une dynamique stochastique des filaments d'actine par un mécanisme de fragmentation des filaments. Cependant il est impossible en microscopie à onde évanescente de mesurer une quelconque accélération de la dépolymérisation progressive des filaments d'actine à leur extrémité pointue en présence d'ADF/cofiline. Ce résultat amène de très nombreuses questions fondamentales quant à la façon dont l'actine retourne rapidement sous forme monomérique. Pour cela, le phénomène de

## Perspectives

fragmentation doit se faire en collaboration avec l'action des protéines de coiffe pour limiter l'élongation des extrémités barbées formées par la coupure. Plusieurs études suggèrent que d'autres familles de protéines telles qu'Aip1 pourraient aussi coopérer avec l'ADF/cofiline et jouer ce rôle de protection des extrémités barbées (Okada et al., 1999), (Okada et al., 2002), (Okada et al., 2006), (Ono et al., 2004). Le grand nombre d'extrémités pointues formées suites aux fragmentations successives suffit-il alors pour expliquer le retour rapide de l'actine sous sa forme monomérique par un processus progressif de dépolymérisation ? Existe-t-il d'autres facteurs cellulaires pouvant accélérer cette dépolymérisation ?

6/ Nous avons montré que le regroupement des filaments d'actine en structures rigides telles que les câbles d'actine s'accompagne d'une stabilisation des filaments d'actine vis-à-vis de l'ADF/cofiline. Nous avons suggéré plusieurs modèles pouvant expliquer ce phénomène, soit que le regroupement des filaments limite leurs fluctuations et ainsi empêche la fixation de l'ADF/cofiline, soit qu'un filament éventuellement fragmenté par l'ADF/cofiline reste en contact avec la structure et puisse fréquemment se rabouter avec les autres filaments, annulant ainsi l'effet de l'ADF/cofiline. Il semble nécessaire dans l'avenir de parvenir à déterminer le mécanisme le plus probable, et de mesurer précisément l'efficacité de l'ADF/cofiline en fonction du nombre de filaments d'actine présents dans le câble.

7/ Puisque l'ADF/cofiline privilégie la formation des câbles d'actine épais et rigides, il se pose maintenant la question du mécanisme employé par les cellules pour désassembler de telles structures ? Existe-t-il d'autres facteurs cellulaires impliqués dans la dissociation des câbles de filaments ? Plusieurs études suggèrent (Ishikawa et al., 2003), (Kovar, 2007) en effet que la force motrice produite par la myosine II pourrait dissocier les câbles de filament d'actine et permettre simultanément leur fragmentation. L'effet de la contractilité offre donc une piste intéressante pour la compréhension du désassemblage des câbles. La compréhension précise de tous ces processus paraît maintenant l'étape indispensable pour pouvoir développer dans les années à venir un modèle complet de la dynamique des câbles d'actine, qui viendrait compléter le modèle de nucléation dendritique valable uniquement pour les réseaux branchés.

8/ Parallèlement à cela, l'ADF/cofiline doit aussi être impliquée dans le désassemblage des réseaux de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3. L'ADF/cofiline accélérant la dissociation du phosphate des filaments d'actine suite à leur hydrolyse, et le complexe Arp2/3 possédant une faible affinité pour l'extrémité pointue de filaments d'actine ADP, l'ADF/cofiline a donc pour effet de diminuer le demi-temps de

vie des branches de 500 s à 30 s (Blanchoin et al., 2000b). Cependant, aucune étude n'a pu jusqu'à présent observer l'effet dynamique de l'ADF/cofiline sur le désassemblage des structures branchées de filament d'actine. L'ADF/cofiline simultanément fragmente les filaments d'actine et dissocie le complexe Arp2/3, mais aucune étude ne s'est intéressée jusqu'à présent à la combinaison de ces deux effets. Un réseau branché de filament d'actine possède-t-il la même rigidité que des câbles de filaments, et limite-t-il ainsi la fixation de l'ADF/cofiline ? L'ADF/cofiline doit-elle donc dans un premier temps dissocier les branches du réseau avant de pouvoir efficacement le désassembler ? Ou l'ADF/cofiline est-elle capable de fragmenter tout le réseau avant que les branches n'aient eu le temps de se dissocier ? Et quel est l'effet de la densité des branches sur le mécanisme de dissociation du réseau ? La microscopie à onde évanescente semble être l'outil tout à fait adapté pour répondre à toutes ces questions et pour réétudier dans le futur la dynamique d'assemblage et de désassemblage des réseaux branchés de filaments d'actine.

# REFERENCES





## Références

- Amann, K.J. and Pollard, T.D. (2001) Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15009-15013.
- Andrianantoandro, E. and Pollard, T.D. (2006) Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell*, **24**, 13-23.
- Arpin, M., Blair, L., Coudrier, E., Dudouet, B., Finidori, J., Carcia, A., Huet, C., Pringault, E., Robine, S. and Sahuguillo-Merino, C. (1988) Villin, a specific marker for some epithelia specialized in transport, to study the differentiation of intestinal and kidney cells in vivo and in a human colon adenocarcinoma line HT29 in culture. *Mol Aspects Med*, **10**, 257-272.
- Basu, R. and Chang, F. (2007) Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 88-94.
- Bernheim-Groswasser, A., Prost, J. and Sykes, C. (2005) Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram. *Biophys J*, **89**, 1411-1419.
- Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R.M., Carlier, M.F. and Sykes, C. (2002) The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature*, **417**, 308-311.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D. (2000a) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *Nature*, **404**, 1007-1011.
- Blanchoin, L. and Pollard, T.D. (1998) Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.*, **273**, 25106-25111.
- Blanchoin, L. and Pollard, T.D. (1999) Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15538-15546.
- Blanchoin, L. and Pollard, T.D. (2002) Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, **41**, 597-602.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D. and Hitchcock-DeGregori, S.E. (2001) Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol*, **11**, 1300-1304.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D. and Mullins, R.D. (2000b) Interaction of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Current Biology*, **10**, 1273-1282.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le\_Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (2001) Listeria protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry*, **40**, 11390-11404.
- Boukellal, H., Campas, O., Joanny, J.F., Prost, J. and Sykes, C. (2004) Soft Listeria: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **69**, 061906.
- Bretscher, A. and Weber, K. (1979) Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2321-2325.

- Burtneck, L.D., Koepf, E.K., Grimes, J., Jones, E.Y., Stuart, D.I., McLaughlin, P.J. and Robinson, R.C. (1997) The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell*, **90**, 661-670.
- Cameron, L.A., Giardini, P.A., Soo, F.S. and Theriot, J.A. (2000) Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 110-119.
- Cameron, L.A., Svitkina, T., Theriot, J.A. and Borisy, G.G. (2001) Dendritic organization of actin comet tails. *Curr Biol*, **11**, 130-135.
- Carrier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H. and Pantaloni, D. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, **136**, 1307-1322.
- Carrier, M.F. and Pantaloni, D. (1986) Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry*, **25**, 7789-7792.
- Carlsson, A.E. (2003) Growth velocities of branched actin networks. *Biophys J*, **84**, 2907-2918.
- Carlsson, A.E., Wear, M.A. and Cooper, J.A. (2004) End versus side branching by Arp2/3 complex. *Biophys J*, **86**, 1074-1081.
- Castrillon, D.H. and Wasserman, S.A. (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*, **120**, 3367-3377.
- Cheung, A.Y. and Wu, H.M. (2004) Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *Plant Cell*, **16**, 257-269.
- Chhabra, E.S. and Higgs, H.N. (2006) INF2 Is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J Biol Chem*, **281**, 26754-26767.
- Combeau, C. and Carrier, M.-F. (1988) Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF<sub>3</sub> and AlF<sub>4</sub>. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17429-17436.
- Cooper, J.A. and Schafer, D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 97-103.
- Cooper, J.A., Walker, S.B. and Pollard, T.D. (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **4**, 253-262.
- Cramer, L.P., Siebert, M. and Mitchison, T.J. (1997) Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol*, **136**, 1287-1305.
- Cvrckova, F. (2000) Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biol*, **1**, 1-7.
- Cvrckova, F., Novotny, M., Pickova, D. and Zarsky, V. (2004) Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms. *BMC Genomics*, **5**, 44.

## Références

- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A. and Southwick, F.S. (1990) *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6068-6072.
- Dayel, M.J. and Mullins, R.D. (2004) Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol*, **2**, E91.
- De La Cruz, E.M. (2005) Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J Mol Biol*, **346**, 557-564.
- Deeks, M.J., Hussey, P.J. and Davies, B. (2002) Formins: intermediates in signal-transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization. *Trends Plant Sci*, **7**, 492-498.
- Dickinson, R.B., Caro, L. and Purich, D.L. (2004) Force generation by cytoskeletal filament end-tracking proteins. *Biophys J*, **87**, 2838-2854.
- Didry, D., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1998) Synergy between Actin Depolymerizing Factor/Cofilin and Profilin in Increasing Actin Filament Turnover. *J. Biol. Chem.*, **273**, 25602-25611.
- Diez, S., Gerisch, G., Anderson, K., Muller-Taubenberger, A. and Bretschneider, T. (2005) Subsecond reorganization of the actin network in cell motility and chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7601-7606.
- Dong, C.H., Xia, G.X., Hong, Y., Ramachandran, S., Kost, B. and Chua, N.H. (2001) ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F- actin organization, cell expansion, and organ growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 1333-1346.
- Drenckhahn, D. and Pollard, T.D. (1986) Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12754-12758.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C. and Bretscher, A. (2002) Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*, **4**, 260-269.
- Faix, J. and Rottner, K. (2006) The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 18-25.
- Feierbach, B. and Chang, F. (2001) Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol*, **11**, 1656-1665.
- Footer, M.J., Kerssemakers, J.W., Theriot, J.A. and Dogterom, M. (2007) Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2181-2186.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T. and Ishiwata, S. (2002) Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol*, **4**, 666-673.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Lukoyanova, N., Wriggers, W. and Egelman, E.H. (2001) Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J Cell Biol*, **153**, 75-86.
- Giardini, P.A., Fletcher, D.A. and Theriot, J.A. (2003) Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6493-6498.

- Goode, B.L. and Eck, M.J. (2007) Mechanism and Function of Formins in Control of Actin Assembly. *Annu Rev Biochem*.
- Gutsche-Perelroizen, I., Lepault, J., Ott, A. and Carlier, M.F. (1999) Filament assembly from profilin-actin. *J Biol Chem*, **274**, 6234-6243.
- Harris, E.S., Li, F. and Higgs, H.N. (2004) The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem*, **279**, 20076-20087.
- Harris, E.S., Rouiller, I., Hanein, D. and Higgs, H.N. (2006) Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J Biol Chem*, **281**, 14383-14392.
- Hatanaka, H., Ogura, K., Moriyama, K., Ichikawa, S., Yahara, I. and Inagaki, F. (1996) Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families. *Cell*, **85**, 1047-1055.
- Haviv, L., Brill-Karniely, Y., Mahaffy, R., Backouche, F., Ben-Shaul, A., Pollard, T.D. and Bernheim-Groswasser, A. (2006) Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4906-4911.
- Higgs, H.N. (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*, **30**, 342-353.
- Higgs, H.N. and Peterson, K.J. (2005) Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell*, **16**, 1-13.
- Hill, T.L. (1981) Microfilament or microtubule assembly or disassembly against a force. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 5613-5617.
- Hochmuth, F.M., Shao, J.Y., Dai, J. and Sheetz, M.P. (1996) Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys J*, **70**, 358-369.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W. and Kabsch, W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature*, **347**, 44-49.
- Howard, J. and Hyman, A.A. (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, **422**, 753-758.
- Huxley, H.E. (1963) The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.*, **7**, 281-308.
- Huxley, H.E. (1968) Structural difference between resting and rigor muscle; evidence from intensity changes in the low-angle equatorial x-ray diagram. *J. Mol. Biol.*, **37**, 507-520.
- Ishikawa, R., Sakamoto, T., Ando, T., Higashi-Fujime, S. and Kohama, K. (2003) Polarized actin bundles formed by human fascin-1: their sliding and disassembly on myosin II and myosin V in vitro. *J Neurochem*, **87**, 676-685.
- Iwasa, J.H. and Mullins, R.D. (2007) Spatial and Temporal Relationships between Actin-Filament Nucleation, Capping, and Disassembly. *Curr Biol*, **17**, 395-406.

## Références

- Janmey, P.A., Hvidt, S., Kas, J., Lerche, D., Maggs, A., Sackmann, E., Schliwa, M. and Stossel, T.P. (1994) The Mechanical-Properties of actin gels - elastic-modulus and filament motions. *J Biol Chem*, **269**, 2503-2513.
- Jean, C., Rieger, K., Blanchoin, L., Carlier, M.F., Lenfant, M. and Pantaloni, D. (1994) Interaction of G-actin with thymosin beta 4 and its variants thymosin beta 9 and thymosin beta met9. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **15**, 278-286.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E. and Holmes, K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, **347**, 37-44.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. and Mabuchi, I. (2005) Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol*, **7**, 916-917.
- Kinosian, H.J., Newman, J., Lincoln, B., Selden, L.A., Gershman, L.C. and Estes, J.E. (1998) Ca<sup>2+</sup> regulation of gelsolin activity: binding and severing of F-actin. *Biophys J*, **75**, 3101-3109.
- Korn, E.D., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. **238**, 638-644.
- Kouyama, T. and Mihashi, K. (1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.*, **114**, 33-38.
- Kovar, D.R. (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 11-17.
- Kovar, D.R. (2007) Intracellular motility: myosin and tropomyosin in actin cable flow. *Curr Biol*, **17**, R244-247.
- Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2006) Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*, **124**, 423-435.
- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L. and Pollard, T.D. (2003) The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *The Journal of Cell Biology*, **161**, 875-887.
- Kovar, D.R. and Pollard, T.D. (2004) Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14725-14730.
- Kuhn, J.R. and Pollard, T.D. (2005) Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J*, **88**, 1387-1402.
- Kumar, N., Tomar, A., Parrill, A.L. and Khurana, S. (2004) Functional dissection and molecular characterization of calcium-sensitive actin-capping and actin-depolymerizing sites in villin. *J Biol Chem*, **279**, 45036-45046.
- Lammers, M., Rose, R., Scrima, A. and Wittinghofer, A. (2005) The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho\*GTP. *Embo J*, **24**, 4176-4187.
- Lappalainen, P. and Drubin, D.G. (1997) Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*, **388**, 78-82.

- Le Clainche, C., Didry, D., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (2001) Activation of Arp2/3 complex by Wiskott-Aldrich Syndrome protein is linked to enhanced binding of ATP to Arp2. *J Biol Chem*, **276**, 46689-46692.
- Li, F. and Higgs, H.N. (2003) The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol*, **13**, 1335-1340.
- Li, F. and Higgs, H.N. (2005) Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem*, **280**, 6986-6992.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**, 613-616.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T.D. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin agarose. *J. Cell Biol.*, **127**, 107-115.
- Machesky, L.M. and Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein WASP regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.*, **8**, 1347-1356.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E. and Pollard, T.D. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3739-3744.
- Maciver, S.K., Wachsstock, D.H., Schwarz, W.H. and Pollard, T.D. (1991a) The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin. *J. Cell Biol.*, **115**, 1621-1628.
- Maciver, S.K., Zot, H.G. and Pollard, T.D. (1991b) Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.*, **115**, 1611-1620.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.F. and Sykes, C. (2004) Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5992-5997.
- Martin, A.C., Welch, M.D. and Drubin, D.G. (2006) Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat Cell Biol*, **8**, 826-833.
- Martin, A.C., Xu, X.P., Rouiller, I., Kaksonen, M., Sun, Y., Belmont, L., Volkmann, N., Hanein, D., Welch, M. and Drubin, D.G. (2005) Effects of Arp2 and Arp3 nucleotide-binding pocket mutations on Arp2/3 complex function. *J Cell Biol*, **168**, 315-328.
- Martin, S.G. and Chang, F. (2006) Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol*, **16**, 1161-1170.
- Mass, R.L., Zeller, R., Woychik, R.P., Vogt, T.F. and Leder, P. (1990) Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature*, **346**, 853-855.
- Matsudaira, P.T. and Burgess, D.R. (1979) Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **83**, 667-673.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W. and Weeds, A. (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell. Biol.*, **138**, 771-781.

## Références

- McGrath, J.L., Eungdamrong, N.J., Fisher, C.I., Peng, F., Mahadevan, L., Mitchison, T.J. and Kuo, S.C. (2003) The force-velocity relationship for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol*, **13**, 329-332.
- Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (2004) Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell*, **118**, 363-373.
- Michelot, A., Derivery, E., Paterski-Boujemaa, R., Guerin, C., Huang, S., Parcy, F., Staiger, C.J. and Blanchoin, L. (2006) A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr Biol*, **16**, 1924-1930.
- Michelot, A., Guerin, C., Huang, S., Ingouff, M., Richard, S., Rodiuc, N., Staiger, C.J. and Blanchoin, L. (2005) The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *Plant Cell*, **17**, 2296-2313.
- Mogilner, A. (2006) On the edge: modeling protrusion. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 32-39.
- Mogilner, A. and Oster, G. (1996) Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J*, **71**, 3030-3045.
- Mogilner, A. and Oster, G. (2003) Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J*, **84**, 1591-1605.
- Moseley, J.B. and Goode, B.L. (2005) Differential activities and regulation of *S. cerevisiae* formins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem*, **280**, 28023-28033.
- Moseley, J.B. and Goode, B.L. (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 605-645.
- Moseley, J.B., Sagot, I., Manning, A.L., Xu, Y., Eck, M.J., Pellman, D. and Goode, B.L. (2004) A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*, **15**, 896-907.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6181-6186.
- Nezami, A.G., Poy, F. and Eck, M.J. (2006) Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure*, **14**, 257-263.
- Nishida, E. (1985) Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, **24**, 1160-1164.
- Noireaux, V., Golsteyn, R.M., Friederich, E., Prost, J., Antony, C., Louvard, D. and Sykes, C. (2000) Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys J*, **78**, 1643-1654.
- Okada, K., Blanchoin, L., Abe, H., Chen, H., Pollard, T.D. and Bamburg, J.R. (2002) Xenopus actin-interacting protein 1 (XAip1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends. *J Biol Chem*, **277**, 43011-43016.
- Okada, K., Obinata, T. and Abe, H. (1999) XAIP1: a Xenopus homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J Cell Sci*, **112**, 1553-1565.



- Okada, K., Ravi, H., Smith, E.M. and Goode, B.L. (2006) Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell*, **17**, 2855-2868.
- Ono, S. (2007) Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol*, **258**, 1-82.
- Ono, S., Mohri, K. and Ono, K. (2004) Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments. *J Biol Chem*, **279**, 14207-14212.
- Otomo, T., Otomo, C., Tomchick, D.R., Machius, M. and Rosen, M.K. (2005a) Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Mol Cell*, **18**, 273-281.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M. and Rosen, M.K. (2005b) Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, **433**, 488-494.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. and Carlier, M.F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science*, **292**, 1502-1506.
- Parekh, S.H., Chaudhuri, O., Theriot, J.A. and Fletcher, D.A. (2005) Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nat Cell Biol*, **7**, 1219-1223.
- Pavlov, D., Muhlrad, A., Cooper, J., Wear, M. and Reisler, E. (2007) Actin filament severing by cofilin. *J Mol Biol*, **365**, 1350-1358.
- Perelroizen, I., Didry, D., Christensen, H., Chua, N.H. and Carlier, M.F. (1996) Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in action assembly. *J Biol Chem*, **271**, 12302-12309.
- Perelroizen, I., Marchand, J.B., Blanchoin, L., Didry, D. and Carlier, M.F. (1994) Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry*, **33**, 8472-8478.
- Peskin, C.S., Odell, G.M. and Oster, G.F. (1993) Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys J*, **65**, 316-324.
- Petrella, E.C., Machesky, L.M., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D. (1996) Structural requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. *Biochemistry*, **35**, 16535-16543.
- Pieper, U. and Wegner, A. (1996) The end of a polymerizing actin filament contains numerous ATP-subunit segments that are disconnected by ADP-subunits resulting from ATP hydrolysis. *Biochemistry*, **35**, 4396-4402.
- Plastino, J. and Sykes, C. (2005) The actin slingshot. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 62-66.
- Pollard, T.D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.*, **103**, 2747-2754.
- Pollard, T.D. (2003) The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature*, **422**, 741-745.
- Pollard, T.D. (2007) Regulation of actin filament assembly by arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **36**, 451-477.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys.*, **29**, 545-576.

## Références

- Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**, 453-465.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1984) Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry*, **23**, 6631-6641.
- Popp, D. and Holmes, K.C. (1992) X-ray diffraction studies on oriented gels of vertebrate smooth muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.*, **224**, 65-76.
- Popp, D., Lednev, V. and W., J. (1987) Methods of preparing well-oriented sols of F-actin containing filaments suitable for X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.*, **197**, 679-684.
- Prass, M., Jacobson, K., Mogilner, A. and Radmacher, M. (2006) Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *J Cell Biol*, **174**, 767-772.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. and Zigmond, S.H. (2003) Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*, **42**, 486-496.
- Prochniewicz, E., Janson, N., Thomas, D.D. and De la Cruz, E.M. (2005) Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J Mol Biol*, **353**, 990-1000.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C. (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, **297**, 612-615.
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E. and Mullins, R.D. (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, **433**, 382-388.
- Ressad, F., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1999) Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20970-20976.
- Ressad, F., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1998) Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. Comparison of plant and human ADFs and effect of phosphorylation. *J Biol Chem*, **273**, 20894-20902.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S. and Louvard, D. (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 635-646.
- Robine, S., Huet, C., Moll, R., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Zweibaum, A. and Louvard, D. (1985) Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8488-8492.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S. and Pollard, T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, **294**, 1679-1684.
- Rogers, S.L., Wiedemann, U., Stuurman, N. and Vale, R.D. (2003) Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells. *J Cell Biol*, **162**, 1079-1088.
- Romero, S., Didry, D., Larquet, E., Boisset, N., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (2007) How ATP Hydrolysis Controls Filament Assembly from Profilin-Actin: IMPLICATION FOR FORMIN PROCESSIVITY. *J Biol Chem*, **282**, 8435-8445.

- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, **119**, 419-429.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A. (2005) Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature*, **435**, 513-518.
- Rould, M.A., Wan, Q., Joel, P.B., Lowey, S. and Trybus, K.M. (2006) Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J Biol Chem*, **281**, 31909-31919.
- Sablin, E.P., Dawson, J.F., VanLoock, M.S., Spudich, J.A., Egelman, E.H. and Fletterick, R.J. (2002) How does ATP hydrolysis control actin's associations? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10945-10947.
- Sagot, I., Klee, S.K. and Pellman, D. (2002a) Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*, **4**, 42-50.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L. and Pellman, D. (2002b) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*, **4**, 626-631.
- Schafer, D.A. and Cooper, J.A. (1995) Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 497-518.
- Schafer, D.A., Jennings, P.B. and Cooper, J.A. (1996) Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.*, **135**, 169-179.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Schleicher, M. and Faix, J. (2005a) Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1256-1259.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. and Faix, J. (2005b) The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol*, **7**, 619-625.
- Schutt, C., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C.W. and Lindberg, U. (1993) The structure of crystalline profilin- $\beta$ -actin. *Nature*, **365**, 810-816.
- Shemesh, T. and Kozlov, M.M. (2007) Actin Polymerization upon Processive Capping by Formin: A Model for Slowing and Acceleration. *Biophys J*, **92**, 1512-1521.
- Shemesh, T., Otomo, T., Rosen, M.K., Bershadsky, A.D. and Kozlov, M.M. (2005) A novel mechanism of actin filament processive capping by formin: solution of the rotation paradox. *J Cell Biol*, **170**, 889-893.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A. and Wittinghofer, A. (2004) The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol Cell*, **13**, 511-522.
- Staiger, C.J. and Blanchoin, L. (2006) Actin dynamics: old friends with new stories. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 554-562.
- Straub, F.B. (1942) Actin. *Studies from the institute of medical chemistry (edited by A. Szent-Györgyi)*. 3-15.

## Références

- Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (1999a) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.*, **145**, 1009-1026.
- Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (1999b) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, **145**, 1009-1026.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M. and Borisy, G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, **160**, 409-421.
- Symons, M.H. and Mitchison, T.J. (1991) Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J Cell Biol*, **114**, 503-513.
- Tang, J.X. and Janmey, P.A. (1996) The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation. *J Biol Chem*, **271**, 8556-8563.
- Theriot, J.A. (1995) The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 213-239.
- Theriot, J.A. and Mitchison, T.J. (1991) Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*, **352**, 126-131.
- Tilney, L.G. and Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **109**, 1597-1608.
- Trichet, L., Campas, O., Sykes, C. and Plastino, J. (2007) VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys J*, **92**, 1081-1089.
- Tseng, Y., Kole, T.P., Lee, J.S., Fedorov, E., Almo, S.C., Schafer, B.W. and Wirtz, D. (2005) How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochem Biophys Res Commun*, **334**, 183-192.
- Upadhyaya, A., Chabot, J.R., Andreeva, A., Samadani, A. and van Oudenaarden, A. (2003) Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4521-4526.
- Van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J. and Sykes, C. (2005) Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7847-7852.
- Van Oudenaarden, A. and Theriot, J.A. (1999) Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat Cell Biol*, **1**, 493-499.
- Vavylonis, D., Kovar, D.R., O'Shaughnessy, B. and Pollard, T.D. (2006) Model of formin-associated actin filament elongation. *Mol Cell*, **21**, 455-466.
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitekina, T. and Borisy, G.G. (2006) Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol*, **174**, 863-875.
- Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitekina, T. and Borisy, G.G. (2003) Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol*, **160**, 951-962.

- Vinson, V.K., De La Cruz, E.M., Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (1998) Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry*, **37**, 10871-10880.
- Wachsstock, D.H., Schwarz, W.H. and Pollard, T.D. (1993) Affinity of alpha-actinin for actin filaments determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys. J.*, **65**, 205-214.
- Wachsstock, D.H., Schwarz, W.H. and Pollard, T.D. (1994) Cross-Linker dynamics determine the mechanical-properties in actin gels. *Biophys J*, **66**, 801-809.
- Wang, Y. (1985) Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.*, **101**, 597-602.
- Way, M., Gooch, J., Pope, B. and Weeds, A.G. (1989) Expression of human plasma gelsolin in *Escherichia coli* and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis. *J Cell Biol*, **109**, 593-605.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A. and Mitchison, T.J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, **281**, 105-108.
- Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (2003) A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J Cell Biol*, **160**, 387-398.
- Xu, J., Tseng, Y. and Wirtz, D. (2000) Strain hardening of actin filament networks. Regulation by the dynamic cross-linking protein alpha-actinin. *J Biol Chem*, **275**, 35886-35892.
- Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L. and Eck, M.J. (2004) Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, **116**, 711-723.
- Yang, H.C. and Pon, L.A. (2002) Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 751-756.
- Yu, X. and Carlsson, A.E. (2003) Multiscale study of counterion-induced attraction and bundle formation of F-actin using an Ising-like mean-field model. *Biophys J*, **85**, 3532-3543.
- Zigmond, S.H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sicheri, F., Forkey, J. and Pring, M. (2003) Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol*, **13**, 1820-1823.



## RESUME :

L'exercice de forces est indispensable au bon fonctionnement de nombreux processus cellulaires. Chez les eucaryotes, une majorité de ces phénomènes motiles est assurée par la polymérisation et la dépolymérisation spatialement et temporellement contrôlée du cytosquelette d'actine. Le cytosquelette est composé de microfilaments d'actine qui s'associent en structures complexes aux propriétés mécaniques particulières. Au cours des dix dernières années, beaucoup d'efforts ont été menés pour comprendre la dynamique des réseaux branchés de filaments d'actine initiés par le complexe Arp2/3. En revanche, peu de choses sont connues à propos de la dynamique de formation et de désassemblage des câbles de filaments d'actine. Récemment, il fut montré que les formines représentent une famille de protéines essentielles à l'initiation de ces structures.

Cette thèse résume dans un premier temps le travail accompli pour comprendre le mécanisme d'action des formines à l'échelle moléculaire. La plupart des formines sont des nucléateurs processifs, c'est-à-dire qu'ils permettent la formation et l'élongation de nouveaux filaments d'actine, tout en restant liées à l'extrémité du filament qui polymérise. Nous avons montré par la technique originale de microscopie à onde évanescente que *Arabidopsis Thaliana* FORMIN1 représente un nouveau type de formine, qui se déplace sur le côté des filaments d'actine après les avoir formés. Depuis le côté d'un filament préexistant, FORMIN1 est capable de nucléer un autre filament, initiant la formation de câbles de filaments d'actine. Dans un deuxième temps, cette thèse s'intéresse au mécanisme moléculaire mis en jeu par l'ADF/cofiline pour accélérer la dynamique de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine, et traite pour la première fois de la dynamique de l'actine en temps réel à l'échelle du filament individuel ou à l'intérieur de structures organisées de filaments d'actine.